

**Aus der Klinik für Neurochirurgie**

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ch. Nimsky  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg**

**Die Expression des  
Calcitonin receptor-like receptors  
in humanen Gliomen**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von**

**Christoph Kappus aus Frankfurt am Main**

**Marburg, 2014**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 08.08.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. Ludwig Benes

1. Korreferent: PD Dr. Astrid Dempfle

2. Korreferent: Prof. Dr. Axel Pagenstecher

## I INHALTSVERZEICHNIS

II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1	EINLEITUNG.....	5
1.1	PRIMÄRE TUMORE DES ZNS.....	5
1.1.1	Klassifizierung.....	5
1.1.2	Angiogenese.....	7
1.2	DER CALCITONIN REZEPTOR-LIKE RECEPTOR.....	11
1.2.1	Struktureller Aufbau.....	11
1.2.2	Vorkommen.....	13
1.2.3	Regulation der CRLR-Expression.....	14
1.2.4	Rezeptorliganden.....	15
1.3	ZIELSETZUNG.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	NACHWEIS AUF RNS-EBENE.....	21
2.1.1	RNS-Isolierung.....	21
2.1.2	Bestimmung der RNS- Konzentration.....	24
2.1.3	RT-PCR (Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion).....	24
2.1.4	Nachweis der DNS.....	27
2.2	HISTOPATHOLOGISCHER NACHWEIS DES CRLR.....	
2.2.1	Präparatvorbereitung.....	30
2.2.2	Zugabe der Antikörper.....	30
2.2.3	Anfärbung.....	31
2.2.4	Evaluation.....	31
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	NACHWEIS DES CRLRS AUF RNS-EBENE.....	33
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES CRLRS.....	34
3.2.1	Blutgefäße.....	34
3.2.2	Tumorzellen.....	37
3.2.3	Neurone.....	40
3.2.4	Zelluläre Lokalisation.....	41
3.2.5	Morphometrie und Statistische Ergebnisse.....	43
4	DISKUSSION.....	51
4.1	ZIELSETZUNG UND ERGEBNISSE.....	51
4.1.1	CRLR-RNA.....	51
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis des CRLR-Proteins.....	52
4.1.3	Quantitativer Vergleich.....	53
4.1.4	Analyse des IRS.....	53
4.1.5	Vergleichbarkeit der Stichproben.....	53
4.2	DER CRLR-REZEPTOR.....	57
4.2.1	CRLR und Adrenomedullin.....	57
4.2.2	CRLR und CGRP.....	62
4.2.3	CRLR und Intermedin.....	64
4.2.4	CRLR und Glucocorticoide.....	63
4.2.5	CRLR und Neurone.....	65
4.3	AUSBLICK.....	65
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	81

## II

## Abkürzungsverzeichnis

ADM	Adrenomedullin
bFGF	Basic Fibroblast growth factor
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CTR	Calcitonin receptor
CRLR	Calcitonin receptor-like receptor
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphaten
DTT	Dithiothreitol
ECM	extracelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
GFAP	Glial fibre acid protein
GPCR	G-Protein coupled Receptor
MMP	Matrix-Metallproteinase
PDGF	Platelet derived growth factor
PP	Prozentsatz positiver Zellen
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimerase chain reaction
RAMP	Receptor activity modifying protein
SI	Staining Intensity
TGF	Tumor growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

## Einleitung

### 1.1 Primäre Tumore des ZNS

Unter primären Tumoren des ZNS werden sämtliche Neoplasien verstanden, die von Hirngewebszellen ausgehen, wobei die Astrozytome mit einer Inzidenz von 44 Prozent aller hirneigenen Tumoren mit Abstand am häufigsten vorkommen. Die biologische Wertigkeit dieser Tumore reicht dabei von relativ benigne bis zu hoch maligne.

Das Glioblastoma multiforme stellt darunter das Neoplasma höchster Malignität dar und macht dabei ca. 50 bis 60% aller astrozytären Tumore und etwa 40% aller glialen Tumore aus [65][91]. Sein Anteil an allen intrakraniellen Tumorerkrankungen beträgt ca. 12-15% [114].

#### 1.1.1 Klassifizierung und Morphologie

Klassifikations- und Grading-Systeme für Tumoren des Neuroepithels haben sich ständig verändert und weiterentwickelt, was hauptsächlich den neu gewonnenen Erkenntnissen über deren Pathogenese zuzuschreiben ist. Die WHO-Klassifikation unterscheidet dabei zwischen vier Graden, WHO I bis IV. Die Grade stellen dabei vor allem einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Bei Läsionen vom WHO-Grad I handelt es sich um Tumore mit einer geringen proliferativen Tendenz, bei denen eine Heilung durch eine komplette Resektion möglich sein kann. Als Tumoren vom WHO°I kommen vor allem das *Pilozytische Astrozytom* sowie das *Subependymale Riesenzellaastrozytom* vor.

Tumore vom WHO-Grad II weisen eine geringe Proliferationstendenz, aber ein diffuses, infiltratives Wachstum auf und neigen dazu, sich zu höhergradigen Tumoren zu entwickeln. Das zu dieser Gruppe gehörende *niedriggradige Astrozytom* manifestiert sich bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen, der Altersgipfel liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Trotz seiner geringen Wachstumstendenz macht sein infiltrierendes Wachstum eine Resektion im Gesunden praktisch unmöglich. Typischerweise treten im Verlauf nach einer

Resektion Rezidive auf, welche eine zunehmende Zellteilungsaktivität und Anaplasie, und somit eine Progression aufweisen. Es lassen sich histologisch drei Typen unterscheiden:

- das *gemistozytische Astrozytom*, dessen Matrix faserreich ist und dessen Tumorzellen ein großes, homogenes Zytoplasma und einen exzentrischen Kern aufweisen
- das *fibrilläre Astrozytom*, welches eine kleinzystisch aufgelockerte Matrix und eine geringe Zelldichte besitzt und aus isomorphen neoplastischen Astrozyten mit kleinen runden Zellen besteht. Alle Zellen zeigen eine starke Akkumulation des immunhistochemisch nachweisbaren sauren Gliafaserproteins *GFAP*
- das *pleomorphe Xanthoastrozytom*

Tumore vom WHO-Grad III wie das *anaplastische Astrozytom* zeigen typische Malignitätsmerkmale wie Kernatypien und erhöhte mitotische Aktivität. Sie unterscheiden sich von WHO II°-Tumoren zudem durch eine erhöhte Zelldichte und in der Zellpolymorphie. Die Prognose ist bei Vorliegen eines solchen Tumors deutlich schlechter, klinisch manifestieren sie sich durch rasches Auftreten von Rezidiven.

Beim *Glioblastoma multiforme* (WHO-Grad IV°) handelt es sich um einen hochmalignen Tumor mit glialem Ursprung. Es manifestiert sich bevorzugt im höheren Lebensalter mit einem Altersgipfel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Es ist der häufigste astrozytäre Tumor und macht 15-20 Prozent aller Hirntumore aus. Das Glioblastom kann sich aus einem niedergradigen Astrozytom entwickeln, oder, mit sehr kurzer klinischer Anamnese, de novo entstehen [71]. Sein Erscheinungsbild ist dabei extrem variabel, was zur Bezeichnung „multiforme“ führt. Eine Immunopositivität für das saure Gliafaserprotein GFAP ist bei diesen Tumoren nachweisbar, wobei einige Glioblastome so entdifferenziert sind, dass nur noch wenig Hinweise für die astrozytäre Herkunft bestehen [11][12]. Bei der histologischen Diagnose orientiert man sich aufgrund des selbst innerhalb der Tumore sehr heterogenen Erscheinungsbildes eher an Gewebsmustern als an einzelnen Zellen. Hierbei sind hochgradig anaplastische gliale Zellen, eine erhöhte mitotische Aktivität, Endothelproliferate und Nekrosen wegweisend [12][71].

Die Art der Behandlung richtet sich nach dem Tumorgrad, was auf seine große praktische Bedeutung hinweist. Einen Überblick über dieses Klassifikationssystem gibt Tabelle 1.

	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
WHO-Bezeichnung	pilozytisches Astrozytom	Astrozytom (niedergradig)	anaplastisches Astrozytom	Glioblastoma multiforme
Histologie	bipolare, "piloide" Zellen, Rosenthal-Fasern, eosinophile Körperchen	Kernatypien	Kernatypien, Mitosen	Kernatypien, Mitosen, Nekrosen und/oder Gefäßproliferationen
Genetische Alterationen	Akkumulation von P53(>50%), Deletion auf Chromosom 17q (<20%)	Mutation von P53 (>25%)	Mutation von P53 (>30%) und P16 (>20%), Deletion auf Chromosom 19q (50%)	Mutation von P53 (>30%) und P16 (>50%), Deletion auf Chromosom 10 (>60%) und 19q (25%), EGF-Rezeptor-Amplifikation (>30%)

**Tabelle 1:** WHO-Klassifikation modifiziert nach Kleihues [63]

### 1.1.2 Angiogenese

Die Angiogenese hat, wie schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt ist, einen erheblichen Anteil an Wachstum und Progress von Tumoren [30]. Tumorzellen sind in der Lage endothelialen Zell-Wachstumsfaktor zu sezernieren und dadurch die Angiogenese zu induzieren, was an in vivo Testsystemen wie dem *Chorioallantoic membrane assay* gezeigt werden konnte [17].

Maligne Tumoren sind in der Regel besser vaskularisiert als ihre benignen Gegenstücke oder Vorläufer, ein Phänomen, das als „switch to the angiogenic state“ bezeichnet wird [30]. Ein Unterdrücken der Tumorangiogenese kann eine Unterdrückung des Tumorwachstums bewirken [63]; einige Präparate, welche sich in Vitro als Inhibitoren der Endothelzellproliferation darstellten, waren in Vivo in der Lage das Tumorwachstum zu hemmen [95][85].

#### *Physiologische Angiogenese*

Im gesunden Säuger gehören Endothelzellen zu den Zellen mit der geringsten Teilungsaktivität [46]. In verschiedenen physiologischen Zuständen, wie z.B. der Wundheilung oder

der Menstruation kommt es zur Aktivierung der Gefäße und zur Angiogenese, um dem veränderten Versorgungsbedarf der Gewebe gerecht zu werden. Dabei löst sich die Gefäßstruktur auf, Endothelzellen und Perizyten teilen sich und wachsen in gerichteter Proliferation aus [35]. Anschließend bildet sich, durch die Neuorganisation der Gefäßstruktur, ein funktionsfähiges Gefäß. Die Angiogenese dient unter physiologischen Bedingungen zur Erhaltung der Sauerstoffversorgung, was vor allem bei der embryonalen Angiogenese der Fall ist. Der der Angiogenese zugrunde liegende biologische und molekulare Mechanismus ist dabei vielseitig und nur zum Teil bekannt. Beim gesunden Säuger befindet sich jeweils nur eine von zehntausend Endothelzellen, das entspricht 0,01 Prozent, in der Mitose. Im Vergleich dazu weist das Darmepithel einen Prozentsatz von 14 Prozent an Zellen in der Replikation auf [46]. Die Regulation des komplexen Wachstums wird über diverse pro- und antiangiogenetische Faktoren wie VEGF, Platelet derived growth factor (PDGF), Angiopoietin-1 und -2, Basic Fibroblast growth factor (bFGF), Epithelial growth factor (EGF) und ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche gesteuert, was an Beispielen aus Uterus und Ovar sowie der Plazenta von Knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte [45].

#### *Pathologische Angiogenese*

Ein Beispiel für eine pathologische Neovaskularisation stellt die diabetische Retinopathie dar, bei der sich ein erhöhter VCAM-1 und VEGF-Spiegel nachweisen lässt [51].

#### *Tumor-Angiogenese*

Auch im Glioblastom sind Gefäßneubildungen ein charakteristisches Merkmal. Es gibt Anlass zu der Vermutung, dass Mediatoren, die unter physiologischen Bedingungen das Wachstum und die Differenzierung von Blutgefäßen regulieren, auch an der Angiogenese bei Tumoren beteiligt sind. Mikroskopisch zeigt sich dies in einer vielfach höheren Gefäßfläche im Gegensatz zum gesunden Gewebe. Brem et al. verwendeten 1974 daher die Gefäße als Grading-Merkmal für Tumore [9], was jedoch kein anerkanntes Grading-Schema beschreibt. Studien an Glioblastomen konnten zeigen, dass ca. 12,5 Prozent der Endothelzellen in Tumoren proliferieren, was eine mehr als 40fache Steigerung im Gegensatz zu normalem Gewebe bedeutet [50][87]. Dabei stellt die Angiogenese vor allem in der frühen Phase der Tumorentstehung einen wichtigen Schritt dar [46].

Die Tumorangiogenese wird entscheidend von der umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) beeinflusst, welche Wachstumsfaktoren freisetzt und speichert. So spielt beispielsweise Tenascin eine wichtige Rolle in der Angiogenese von Glioblastomen und gleichzei-



tig bei der Störung der Bluthirnschranke [93]. Zudem verändern auch die einwachsenden Zellen das sie umgebende Milieu, woraus dann innerhalb kurzer Zeit eine eigene perivaskuläre Matrix entsteht [13]. Zwei weitere wichtige Faktoren in der Aktivierung des „angiogenic switch“ sind Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Vascular endothelial growth factor (VEGF) [1].

Eine wichtige Rolle bei der Migration der Endothelzellen als auch bei der Speicherung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren kommt dabei der extrazellulären Matrix zu. Hierbei spielen MMPs eine wichtige Rolle, indem sie die Moleküle der Extrazellulärmatrix spalten und eine gerichtete Migration ermöglichen, aber auch eine frühzeitige Apoptose der Endothelzellen verhindern [111].

Antiangiogene Faktoren wie z.B. Angiostatin sind in der Lage das Tumorwachstum und teilweise auch die Entdifferenzierung bei Glioblastomen zu unterdrücken [60].

Aus diesen Substanzen entwickelte Medikamente bilden einen Pool aus potentiellen, antiangiogenen Therapeutika. Da es sich jedoch um sehr lokal begrenzte Vorgänge handelt, rückt hier die Gentechnik in das Zentrum weiterer Nachforschungen. Eine große morphologische Ähnlichkeit der neu entwickelten Gliomgefäße wurde zu Gefäßen im embryonalen ZNS festgestellt [114].

Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass sich die Mechanismen der embryonalen Angiogenese und der Tumorangiogenese in vielen Punkten ähneln und analoge Mechanismen die Gefäßbildung und Struktur derselben steuern [88][89]. Gefäßneubildung ist auch in hypoxischen Tumorarealen zu beobachten, was an Zelllinien von kolorektalen Adenokarzinomen gezeigt werden konnte [86].

Der Hauptanteil der Angiogenese bei Glioblastomen erfolgt auf der Ebene der Kapillarsprossung. Bei der mikroskopischen Betrachtung finden sich im gesamten Tumorgewebe auffällige girlandenförmige Gefäßproliferate. Vornehmlich im Randbereich, jedoch auch zentral zeigen sich ausgedehnte Nekroseareale sowie Zonen mit frischen Einblutungen. Die Einblutungen zeigen sich als Folge des gestörten strukturellen Aufbaus der dadurch fragilen Blutgefäße. Elektronenmikroskopisch erscheint das tumoröse Gefäßendothel teilweise lückenhaft. Trotz der übermäßigen Kapillarsprossung kommt es aufgrund des schnellen Wachstums zu einer Minderdurchblutung in einigen Tumorarealen, woraus unter anderem die Nekrosen entstehen, welche bei Glioblastomen so typisch sind, dass sie lange Zeit als zwingendes Einschlusskriterium bei der neuropathologischen Diagnose galten.

Zusammengefasst wird die Angiogenese unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen durch das Zusammenwirken einer Vielzahl von Proteinen gesteuert. Im Vordergrund standen hierbei bisher die „klassischen“ Faktoren, zu denen VEGF1, FGF-2, TGFs, Angiopoetine, PDGF, Thrombospondin-1 und Angiostatin gehören [20][22][31][94][98][99]. In letzter Zeit gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass neben diesen klassischen Faktoren auch eine Vielzahl weiterer Peptide eine wichtige regulatorische Rolle bei der Angiogenese spielen. Genannt seien hier das Erythropoietin, Angiotensin II, Endotheline, Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid, Urotensin-II, Adipokine, Neuropeptid Y, Vasoaktives Intestinales Peptid, Substanz P und nicht zuletzt Adrenomedullin [95]. Diese bewirken dabei direkte Effekte auf die Angiogenese und / oder interagieren mit klassische Faktoren, vornehmlich mit VEGF.

## 1.2 Der Calcitonin receptor-like receptor (CRLR)

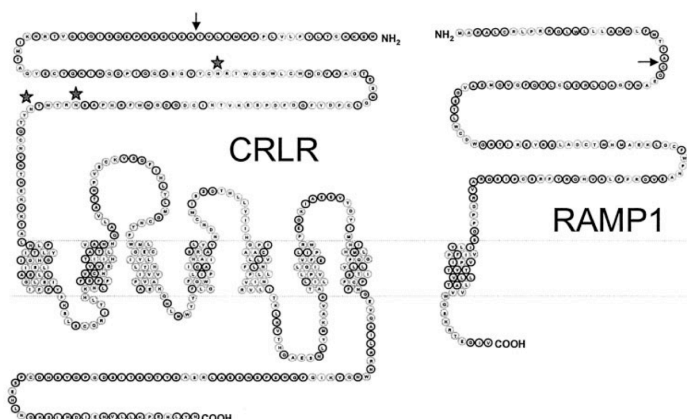
### 1.2.1 Struktureller Aufbau

Bei dem CRLR handelt es sich um ein Mitglied der so genannten Familie B der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welcher ebenso Rezeptoren für Peptidhormone wie Calcitonin, Parathormon, Sekretin und VIP zugehören.

Bei der humanen Variante des Rezeptors handelt es sich um den *Homo sapiens calcitonin receptor-like receptor* (CALCRL) mit der NCBI Reference Sequence: NM\_001271751.1.

In der aktuellen Literatur ist dabei sowohl die Bezeichnung CLR, als auch CRLR üblich, in dieser Arbeit wird die zum Zeitpunkt der Datenerhebung übliche Abkürzung CRLR verwendet. Der humane CRLR besteht aus 462 Aminosäuren. Er setzt sich aus den für G-Protein-gekoppelten Rezeptoren charakteristischen Abschnitten zusammen: Extrazellulärdomäne, 7 Transmembrandomänen und Intrazellulärdomäne. Das C-terminale Ende befindet sich intrazellulär, das N-terminale extrazellulär. Die Synthese des Rezeptors geschieht am endoplasmatischen Retikulum, von hier erfolgt sein Transport zur Zellmembran [101].

Der CRLR zeichnet sich durch die Besonderheit aus, dass er für seine Funktionalität und seine Ligandenspezifität akzessorische Proteine benötigt. Diese Proteine werden Rezeptoraktivitäts-modifizierende Proteine (RAMPs) genannt und modulieren nicht nur die Pharmakologie des CRLRs [43][73] sondern auch die anderer Rezeptoren, wie dem Calcitonin Rezeptor (CTR) [13][16][78].

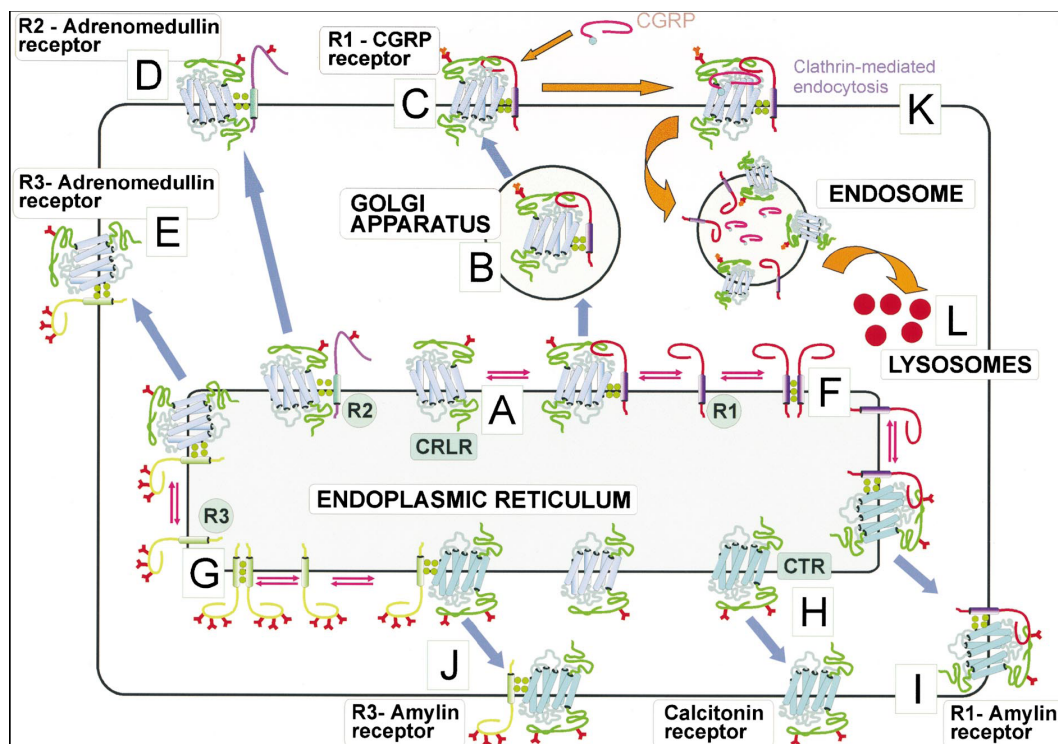


**Abb. 1:** CRL-Rezeptor mit RAMP1

Schematisches Diagramm eines humanen CRLR und RAMP1. Die Sterne bezeichnen Stellen mit Glycosilierungen [90].

Bisher wurden drei Isoformen der RAMPs beschrieben, welche als RAMP1, RAMP2 und RAMP3 bezeichnet werden. Unterschiedliche Kombinationen des CRLRs mit den RAMPs

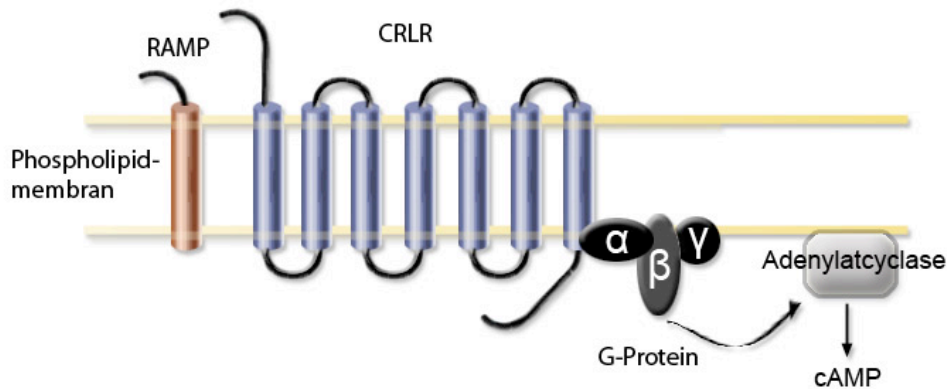
bestimmen die Ligandenspezifität und die funktionelle Antwort des Rezeptors [10][28][58][73]. So entsteht durch die Koexpression und Kopplung des CRLRs mit einem RAMP1 ein CGRP-Rezeptor, durch die Koexpression und Kopplung mit einem RAMP2 oder einem RAMP3 ein Adrenomedullin-Rezeptor [58][73]. Die Affinität eines weiteren Liganden, dem Intermedin oder synonym Adrenomedullin2 ist bei Koexpression und Kopplung des CRLR an RAMP3 am höchsten und entspricht dort der des Adrenomedullin [49].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen mit RAMP's.

**A:** RAMP's vermitteln den Transport des CRLR vom intrazellulären Kompartiment zur Zelloberfläche. **B:** RAMP1 (nicht RAMP2 und 3) modifizieren die terminale Glycosylierung des CRLR **C:** Der CRLR-RAMP1 Komplex an der Zelloberfläche wird zum Typ1 CGRP-Rezeptor, welcher eine 1:1 Stöchiometrie darstellt. **D+E:** Die CRLR-RAMP2 und CRLR-RAMP3 Komplexe bilden einen Adrenomedullin Rezeptor **F+G:** RAMP-Dimere mit bisher nicht bekannter Funktion **H-J:** Bildung von Calcitoninrezeptoren und Amylinrezeptoren **K:** Durch Agonisten herbeigeführte, clathrin-abhängige Wiederaufnahme des Rezeptors in die Zelle **L:** Aufnahme des internalisierten Rezeptorkomplexes und lysosomaler Abbau [101]

Die Signaltransduktion des Rezeptors erfolgt hauptsächlich über den sogenannten Protein-kinase-A-cAMP Weg, wie in Abb. X dargestellt.



**Abb. 3:** Unspezifischer CRLR-Rezeptorkomplex mit G-Protein

*Schematische Darstellung eines CRLR-Rezeptorkomplexes, welcher seine Wirkung über das gekoppelte, so genannte G-Protein entfaltet. Durch dieses erfolgt dann die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels.*

### 1.2.2 Vorkommen

Trotz inzwischen weitreichender Erkenntnis bezüglich der beiden Liganden Adrenomedullin und CGRP des CRLR-Rezeptors, welcher einen Teil des funktionellen Rezeptors für diese Proteine bildet, ist sein Vorkommen in den unterschiedlichen Geweben nur sehr lückenhaft erforscht. Bei Menschen erfolgte zunächst der Nachweis des Rezeptors in der Haut, dem Endothel, der glatten Gefäßmuskulatur sowie in Hirnarterien [25][39][58].

Auf den Nachweis des CRLR in kultivierten Endothelzellen folgte sodann der Nachweis in zahlreichen Organen, einschließlich Lunge, Herzventrikel und Niere. Auch im Endothel von Blutgefäßen, einschließlich großer und kleiner Arterien, Venen und Kapillaren sowie in Herzmuskelzellen und im Endokard konnte der CRLR nachgewiesen werden. In der Lunge zeigte sich eine Expression des Rezeptors in alveolären Kapillaren, im Verdauungstrakt in exkretorischen Anteilen der Glandula parotis, dem Magenfundus, endokrinen Zellen des Duodenums und des Ileums sowie in einigen myenterischen Ganglien. Die Niere zeigte sich positiv im Bereich juxtaglomerulärer Arterien, glomerulärer Kapillaren und im Bereich der Sammelrohre. Zudem gelang der Nachweis in den Langerhansschen Zellen des

Pankreas und schwach ausgeprägt in den Leydigischen Zwischenzellen der Hoden. Im Bereich trabekulärer Venen und Sinus der Milz wurde eine ausgeprägte immunhistochemische Anfärbung nachgewiesen. Auch Makrophagen zeigten sich in unterschiedlicher Ausprägung immunoreaktiv [41]. Zudem konnte der Rezeptor auch in Osteoblasten nachgewiesen werden [81].

Neben gesundem Gewebe wurde der Rezeptor auch in krankhaftem nachgewiesen. So gelang ein weiterer Nachweis des Rezeptors in unterschiedlichen vaskulären Tumoren wie den Kaposi Sarkomen und kapillären Hämangiomen, [40] sowie auch in Leiomyomen des Uterus [82].

### ***1.2.3 Regulation der CRLR-Expression***

Die Expression des CRLR Komplexes unterliegt einer bisher nur in Ansätzen erforschten Dynamik. Veränderungen wurden bisher unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht.

Eine vermehrte Gen-Transskription des CRLRs konnte in Endothelzellen unter Hypoxiebedingungen nachgewiesen werden. Die gleichzeitig beobachtete vermehrte Transskription seines Liganden Adrenomedullin kann dabei als wichtiger Hinweis für die Rolle des Rezeptors bei der Gefäßreaktion bei Ischämie im Sinne der Bildung eines Überlebenskreislaufes sein.

Auch zeigten sich Veränderungen unter der Therapie mit Glukocortikoiden; so konnte in Osteoblasten eine verminderte Expression der CRLR-mRNS unter Glukocortikoidtherapie nachgewiesen werden [110]. Dagegen zeigte sich in glatten Gefäßmuskelzellen der Koronarien eine vermehrte Expression der CRLR-mRNS unter Dexamethasontherapie [32].

Insgesamt betrachtet stellt die Expression sowie deren Regulation noch ein weitgehend unbekanntes Kapitel dar, sodass hier ein großer Bedarf an weiterer Erforschung zum besseren Verständnis besteht. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse weisen auf die wichtige Rolle des Rezeptorkomplexes bei zahlreichen Vorgängen hin.

#### **1.2.4 Rezeptorliganden**

Der CRLR stellt, nach entsprechender Modifizierung und Kopplung an das jeweilige RAMP, den Rezeptor für Adrenomedullin oder Calcitonin-Gene-related (CGRP) dar. Beide Peptide gehören zur sogenannten Calcitonin-gene-related-Peptide-Familie, zu denen auch Calcitonin und Amylin gehören [77]. Die Wirkung dieser Proteine unterscheidet sich dabei nach dem heutigen Wissensstand teilweise deutlich. Verbreitung in unterschiedlichen Geweben und Vermittlung von biologischen Effekten scheinen dabei beim Adrenomedullin im Vergleich zu seinen Verwandten sehr viel weiter gefächert zu sein.

#### **Adrenomedullin (ADM)**

Adrenomedullin wurde 1993 aus humanen Phäochromozytomen isoliert. Die vasodilatorische und hypotensive Wirkung des Peptids konnte hier erstmals gezeigt werden [61].

Auch konnte sein Vorkommen in zahlreichen humanen Geweben und Zellen nachgewiesen werden, unter anderem im Gefäßendothel, im Endothel umbilikaler Venen, in endokrinen Zellen der Nebennierenrinde und der Nebenniere, in einigen Kerngebieten des zentralen Nervensystems, zahlreichen Blutzellen, der Niere, dem Respirationstrakt, dem Endometrium, seinem Epithel und seinen Makrophagen, der Haut, in Fibroblasten sowie dem embryonalen Skelett [52][49]. Lediglich die Zellen des Thymus und der Schilddrüse zeigten in den bisherigen Untersuchungen keine Expression von ADM [75].

Auch in zahlreichen Tumorzellen, so in Pheochromozytomzellen, Glioblastomzellen und Kolorektalen-Karzinomzellen, gelang der Nachweis von ADM [96][79][80][108].

Nach dem Nachweis des Proteins im humanen Plasma wurde zudem bei zahlreichen Erkrankungen eine erhöhte ADM-Plasmakonzentration nachgewiesen [52]. In bestimmten Krankheitsstadien, vor allem bei cerebrovaskulären Erkrankungen, ergeben sich Hinweise darauf, dass die Adrenomedullin-Plasmakonzentration den Grad des Endothelzellschadens reflektiert [66].

Hierbei bleibt jedoch unklar, ob erhöhte Adrenomedullin-Plasmakonzentrationen ihre Ursache in vermehrter Sekretion oder in vermindertem Abbau finden. In vivo zeigten sich Veränderungen in der Adrenomedullin-Plasmakonzentration unter verschiedenen physiologischen und endokrinologischen Bedingungen. Hier zeigten sich jedoch in den unter ver-

schiedenen Bedingungen durchgeführten und in unterschiedlichen Organsystemen gemessenen Dynamiken teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Eindeutig konnte jedoch eine Erhöhung der Adrenomedullin-Plasmakonzentration bei Sepsis und in der Schwangerschaft gezeigt werden. Insgesamt scheint es daher naheliegend, dass in den unterschiedlichen Organsystemen unterschiedliche Mechanismen zur Regulation bestehen [52]. Auch zeigten sich teilweise Veränderungen der ADM-Konzentration nach Glukokortikoidgabe [26][47][67]. Es konnte gezeigt werden, dass ADM in vivo und in vitro eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität von Osteoblasten entfaltet [18][44][81].

Es gibt vielfach Hinweise darauf, dass ADM das Tumorwachstum von Gliomen und anderen Tumoren beeinflusst. Hierbei scheint ein entscheidender Anteil die Wirkung des Peptids auf die Angiogenese zu sein. Beispielsweise korreliert in Leiomyomen die Expression von ADM mit der Gefäßdichte und dem endothelialen Zell-Proliferationsindex [42].

Durch Transplantation körperfremden Gewebes von menschlichem Endometrium, Brust- und Pankreastumor-Zelllinien in SCID-Mäuse zeigte sich eine erhöhte Gefäßdichte oder gesteigertes Gefäßwachstum in den ADM überexprimierenden Transfektanten [56][72][83].

Ähnliche Effekte konnten nach Transplantation von menschlichen Glioblastomzellen in Nacktmäuse beobachtet werden [85]. Die quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse zeigte, dass Adrenomedullin mRNA mit dem Tumorgrad korreliert. Es zeigte sich eine hohe Expressionsrate in Glioblastomen, eine niedrige in anaplastischen Astrozytomen und eine sehr niedrige in niedergradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen. Das Wachstum von etablierten Glioblastom-Xenografts wird in Anwesenheit von Adrenomedullin-Antikörpern signifikant supprimiert [6].

Neueren Studien zufolge bewirkt ADM nicht nur die Differenzierung von dem Knochenmark entstammenden mononukleären Zellen zu Endothelzellen sondern auch die Formation dieser Zellen zu Gefäßen [57]. Adrenomedullin verhindert zudem die Apoptose von Endothelzellen und Tumorzellen oder verstärkt deren Apoptoseresistenz [59][72][83]. Zudem wurden zahlreiche andere Effekte des Proteins nachgewiesen.

In in vivo Assays stimulierte Adrenomedullin die Bildung neuer Gefäßformationen im Chorioallantoic Membrane Assay sowie bei experimentell induzierter Ischämie. Zudem zeigte Adrenomedullin einen stimulierenden Effekt auf Tumorwachstum und die Vaskularisation sowie eine Steigerung der VEGF-Ausschüttung [95].



In einer jüngeren Studie wurde die Rolle des Adrenomedullins in vitro auf vaskuläre Endothelzellen untersucht, wobei für die Versuche normale, ausgereifte Zellen verwendet wurden, welche menschlichen Saphena-Venen entstammten. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Bindung von Adrenomedullin an seinen Rezeptorkomplex (CRLR/RAMP2) spezifisch die Zellproliferation und die Gefäßdifferenzierung vermittelten [38].

Zusammengefasst bestehen die bisher in vitro und in vivo nachgewiesenen, durch Adrenomedullin vermittelten Effekte in den verschiedenen Geweben aus Vasodilatation, Diurese und Natriurese, positiven inotropen Effekten, Inhibition der endothelialen Zellapoptose, Induktion von Angiogenese, Inhibition von kardiomyozytärer Apoptose, Suppression der Aldosteronproduktion, antiinflammatorischen Aktivitäten und antioxidativen Aktivitäten. Eine Vielzahl der durch Adrenomedullin vermittelten Vorgänge sind auch Grundbestandteil der Tumorgenese.

### **Calcitonin-Gen-related-Peptide (CGRP)**

Wie auch beim Adrenomedullin konnte die Wirkung des CGRP auf eine große Anzahl biologischer Effekte nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich zunächst der starke vasodilatatorische Effekt des Proteins [7][8]. Trotz der vasoaktiven Effekte scheint das Protein jedoch keine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks unter physiologischen Bedingungen innezuhaben. Anknüpfend an die vorher genannten Beobachtungen zeigt sich auch ein erhöhter CGRP-Plasmaspiegel während der Schwangerschaft; der mit der Pre-Eklampsie assoziierte hohe Blutdruck wird dabei in Zusammenhang mit einem Mangel an CGRP-Rezeptor Komponenten gesehen [23].

Das Vorkommen spezifischer CGRP-Rezeptoren konnte auf duralen Mastzellen nachgewiesen werden, von denen aus durch CGRP die Ausschüttung von Cytokinen und inflammatorischen Agentien während neurogener Entzündungsreaktionen vermittelt wird [110]. Zudem zeigten sich postsynaptische CGRP-Rezeptoren sensorischer Neurone im Nucleus trigemini des Hirnstamms [27][68][104].

Auf den Erkenntnissen der stark vasodilatativen Effekte basierend zeigten sich die bei Gesunden eher niedrigen CGRP-Plasmaspiegel bei verschiedenen Erkrankungen, wie dem Raynaud-Syndrom oder der Migräne, erhöht, was Hinweise auf seine Rolle bei der Pathophysiologie dieser Erkrankungen gibt [7]. Bezüglich der Pathophysiologie der Migräne wird angenommen, dass intrakranielle, extrazerebrale Blutgefäße wie die Arteria meningea

media und ihre Arteriolen, welche die Duraschicht versorgen, eine Vasodilatation verursachen, welche dadurch die Entstehung der Schmerzen verursachen. Es ergeben sich jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass CGRP nicht allein durch seine vasodilatorischen Aktivitäten an der Schmerzentstehung beteiligt ist. Ergebnisse von Studien weisen vielmehr auf eine sensorisch-neuronale Komponente, vermittelt durch CGRP bei Migräne hin [104]. Die Hinweise auf die neuralen Aktivitäten des CGRP werden dabei durch den Nachweis des reichlichen Vorhandenseins von CGRP-Rezeptoren auf sensorischen Nerven erhärtet [19]. Die Erforschung des CGRP-Rezeptors führte zur Entdeckung einer eigenen Rezeptorfamilie. Pharmakologische Analysen führten zur initialen Klassifikation zweier unterschiedlicher Rezeptoren, dem CGRP1 und dem CGRP2. Hierbei zeigte sich der CGRP1 als der primäre und prädominante kardiovaskuläre Rezeptor. Ein Fragment des Rezeptors, CGRP(8-37), zeigte sich als selektiver Antagonist dieses Rezeptors und findet als solcher weit verbreitete Anwendung [7].

Die Liganden, welche zur Klassifikation des CGRP2 Rezeptors eingesetzt wurden, werden inzwischen als nicht selektiv eingestuft, das Wissen über die Relevanz dieses Rezeptors, vor allem auf molekularer Ebene, ist daher sehr eingeschränkt und lückenhaft. Aus diesem Grund wird daher aktuell nicht mehr zwischen den zwei Subtypen CGRP1 und 2 unterschieden, sondern lediglich der Terminus CGRP benutzt [48].

Zusammengefasst ergeben sich aus der bestehenden Datenlage überwiegend Hinweise auf den Zusammenhang des CGRP hinsichtlich der Pathophysiologie der Migräne. Bei der Migräne handelt es sich um ein weit verbreitetes Phänomen, mit teilweise beschriebenem Vorkommen bis zu 15 Prozent der Population, vor allem bei Frauen. Sie ist assoziiert mit einem lähmenden, primären, pulsierenden und unilateralen Kopfschmerz und einer Reihe von begleitenden Symptomen. CGRP ist im trigeminovaskulären System lokalisiert, wo es potente vasoaktive und nozizeptive Effekte aufweist. Versuche an Primaten und Nagern konnten zeigen, dass die über den Nervus trigeminus vermittelte neurogene Vasodilatation durch CGRP-Antagonisten inhibiert werden kann [24].

Ebenfalls an Primaten konnte bereits 1996 gezeigt werden, dass die Applikation von CGRP in den Liquorraum in der Lage ist den auf eine Subarachnoidalblutung folgenden Vasospasmus zu unterdrücken [55]. Ein ähnlicher Effekt konnte bei intrathekalen Applikationen in Experimenten mit Ratten nachgewiesen werden [54].

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass im Rahmen des Vasospasmus eine herabgesetzte Empfindlichkeit der Blutgefäße gegenüber CGRP besteht [106].

Diesen Erkenntnissen zufolge existieren weitere wichtige Funktionen bei pathologischen Vorgängen, vor allem vasogener Art, welche auf die weit gefächerten Effekte dieses Proteins schließen lassen.

### **Intermedin (Adrenomedullin2)**

Vorkommen und biologische Aktivitäten des Intermedin sind wesentlich weniger erforscht als die des ADM. Die höchste Affinität des CRLR für Intermedin wird durch Koexpression an RAMP3 erreicht, wobei die Affinität dieses Rezeptors für Adrenomedullin etwa gleich hoch ist. Insgesamt ähneln die bisher bekannten Funktionen des Intermedins denen des Adrenomedullins, wobei diese wesentlich schwächer ausgeprägt zu sein scheinen. Als Beispiel hierfür weisen Knockout-Mäuse ohne RAMP3 keine nachweisbaren Gefäßveränderungen auf und zeigen keine verkürzte Lebenserwartung, wohingegen solche ohne AM, CRLR oder RAMP2 aufgrund erheblicher Gefäßdeformitäten in utero versterben [49]. Als Ligand des CRLR sei das Intermedin hier trotzdem erwähnt, mögliche Funktionen bei der Tumorgenese müssen jedoch abgewartet werden.

### 1.3 Zielsetzung

Der CRLR konnte bisher in zahlreichen peripheren Geweben sowie im Gefäßendothel nachgewiesen werden. Ebenso konnte die Teilhabe seiner Liganden an zahlreichen biologischen Vorgängen aufgezeigt werden. Eine Gewebeischämie und Hypoxie führt zu einer Hochregulation von Adrenomedullin. Die Gewebeischämie spielt auch beim Wachstum von Gliomen eine entscheidende Rolle. Hier konnte bereits eine erhöhte Expression des Adrenomedullins in Glioblastomen nachgewiesen werden. Ob sein Rezeptor in humanen Gliomen überhaupt exprimiert wird, ist bisher noch nicht bekannt. Deshalb ist ein Ziel dieser Arbeit, diesen Rezeptors in humanen Gliomen nachzuweisen. Hierzu sollten zunächst Glioblastomzelllinien mittels RT-PCR auf die m-RNA des Rezeptors untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die immunhistochemische Untersuchung auf das Vorkommen des Calcitonin-like receptors in humanen Gliomen sowie seine quantitative Verteilung in Abhängigkeit vom entsprechenden WHO-Grad. Zudem soll die Verteilung des Rezeptors in Abhängigkeit vom sauren Gliafaserprotein (GFAP) untersucht werden. Hierzu sollen aus neurochirurgischen Routineoperationen gewonnene Tumorproben, welche in Paraffinblöcken konserviert vorliegen, verwendet werden. Der Nachweis des Rezeptors soll in Schnittpräparaten durch Immunhistochemie erfolgen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Nachweis auf RNS-Ebene**

Es wurden zwei primäre Glioblastom-Zelllinien verwendet, welche freundlicherweise durch Prof. Dr. H. D. Mennel, zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente Leiter der Neuropathologischen Abteilung am Universitätsklinikum Marburg, zur Verfügung gestellt wurden:

- **G 109 (humane Gliomzelllinie von primären Gliomen)**
- **G 139 (humane Gliomzelllinie von sekundären Gliomen)**

#### **2.1.1 *RNS-Isolierung***

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen ergriffen:

- Wasser und alle wässrigen Lösungen wurden für mindestens eine Stunde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Endkonzentration 0,2 Prozent (v/v)) vorbehandelt und anschließend 30 Minuten bei 121°C autoklaviert.
- Glasgeschirr wurde durch Backen bei 300°C für mindestens 4 Stunden im Trockenschrank von RNasen befreit.
- Zellkulturplastikschalen wurden direkt aus der Originalverpackung entnommen und gelten wegen ihrer Herstellung (automatischer Guß, Verpackung) als RNase-frei.
- Alle Arbeitsschritte wurden mit Latexhandschuhen durchgeführt.
- Es wurden abgetrennte und entsprechend gekennzeichnete Laborregale und Laborschränke verwendet.

Zur Gewinnung der CRLR-RNS aus den Kulturen der humanen Glioblastomzellen wurde das „RNeasy-Kit“ der Firma QIAGEN® eingesetzt.

Die konfluent in Kultur wachsenden Glioblastomzellen wurden für 3 Minuten mit Trypsin/EDTA 0.25% von der Unterlage abgelöst und zur Gewinnung des Zellpellets 5

Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Die entsprechende Menge RLT-Puffer wurde der Probe zugegeben und mit einer autoklavierten Pipette gemischt, bis keine Zellklumpen mehr vorhanden waren. RLT ist eine Denaturierungslösung, die alle Proteine augenblicklich so denaturiert, dass sie funktionsunfähig sind. Dadurch erfolgte die Homogenisierung. Um die Voraussetzungen einer selektiven Bindung von der CRLR-RNS an der „RNeasy Membran“ zu schaffen, wurde der Probe 600µl 70 Prozent Ethanol zugesetzt und durch Pipettieren gemischt. 700µl der Mischung wurden in die im Kit enthaltene RNeasy Mini-Säule gegeben, welche sich in einem 2ml Sammelröhrchen befand, und 15 Sekunden bei 12,000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 2ml Sammelröhrchen überführt. Es wurden 500µl *RPE-Puffer* auf die Säule pipettiert und zum Waschen bei 8000g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde mit RW1-Puffer wiederholt und anschließend für zwei Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, um die Membran zu trocknen.

Bestandteile des *RPE-Puffers* und des *RW1-Puffers* sind dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

Die Säule wurde in ein neues 1,5ml Sammelröhrchen überführt, ohne sie erneut mit dem ausgewaschenen Ethanol zu kontaminieren, da dieser die Folgereaktionen stören könnte. Zum Eluieren der RNS wurde 30µl DEPC-behandeltes Wasser direkt auf die Membran pipettiert und eine Minute bei 10,000 g zentrifugiert (s. Abb. 5).

Die RNS-Präparationen wurden bei -80°C aufbewahrt.

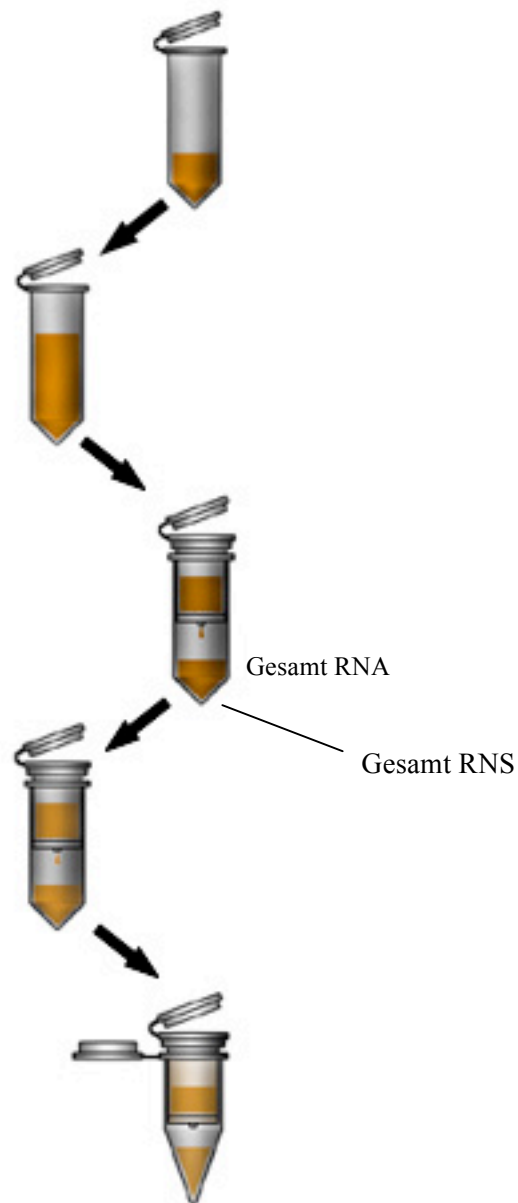
Zerkleinern und Lysieren der Zellen mit Guanidine Isothiocyanat-haltigem Puffer (Buffer RLT), anschließend homogenisieren

Zugabe von Ethanol, um ein Bindungsmilieu zu erreichen

Einfüllen der Probe in die Zentrifugiersäule, um die RNS an die Membran anzulagern

Beseitigen der Rückstände durch zwei Waschgänge (RW1- und RPE-Puffer)

Auslösen der fertigen RNS in Wasser



**Abb. 4:** Einzelne Arbeitsschritte zur Reinigung und Isolierung der RNS

### **2.1.2 Bestimmung der RNS- Konzentration**

Eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine und organische Lösungsmittel wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde eine 1:100 Verdünnung der entsprechenden RNS-Präparationen mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Anschließend wurde die Absorption bei 260nm und 280nm gemessen. Ein  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ließ auf eine für die nachfolgenden Untersuchungen ausreichende Reinheit der DNS oder RNS schließen.

### **2.1.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion)**

Dieser Versuch bestand aus einer Zweistufenreaktion. In der ersten Stufe wurde in der extrahierten RNS vorhandene mRNA mittels reverser Transkription in cDNS umgeschrieben. In der nächsten Stufe wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) das CRLR-Transskript herausamplifiziert.

Die *Reverse Transkriptase* ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase, die eine einzelsträngige RNS als Matrize braucht. In Gegenwart eines kurzen Oligonukleotids „Primer“ synthetisiert sie in 5' → 3' Richtung eine komplementäre DNS (cDNS). Da dieses Enzym gleichzeitig *RNase-H-Aktivität* besitzt, wird es lediglich zur Synthese des ersten DNS-Stranges benutzt, worauf sich die PCR anschließt. Die hier verwendete reverse Transkriptase *Superscript Plus<sup>TM</sup>* (Life Technologies, Promega) ist eine RNase-H-Mutante der aus dem murinen Retrovirus Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) isolierten Transkriptase. Diese modifizierte Version des klonierten Gens weist eine Punktmutation in der RNase-H-codierenden Sequenz auf. Deshalb baut diese Variante während der Synthese des ersten Stranges die RNS nicht ab und synthetisiert deshalb mehr cDNS-Moleküle, die die vollständige Länge der mRNA abdecken.

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNS-Abschnitte, die von zwei bekannten DNS-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Um DNS mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer. Bei diesen handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNS-



Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNS-Matrize (*template*) sind. Eine DNS-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von *Desoxynukleosidtriphosphaten* (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNS-Matrize und synthetisiert so neue DNS-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Zur Vervielfältigung der DNS des CRLR-Rezeptors wurde die Taq- DNS-Polymerase verwendet.

Die Taq-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus*. Die optimale Temperatur für dieses Enzym liegt bei 70-80 °C. Bei dieser Temperatur synthetisiert sie DNS mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nucleotiden pro Sekunde. Sie gehört zu den hochprozessiven DNS-Polymerasen, dies bedeutet, dass die durchschnittliche Zahl der Nucleotide, welche die Taq-Polymerase in die DNS einbaut, bevor sie von der Matrize abfällt, im Verhältnis zu anderen Enzymen sehr hoch ist. Die Taq-Polymerase hat eine 5'→3'- Exonucleaseaktivität, die Nucleotide vor der Polymerase abbaut. Sie hinterlässt an ihren Reaktionsprodukten Überhänge von einzelnen 3'-dA-Nucleotiden. Diese Basen muss man bei der Klonierung der PCR-Produkte berücksichtigen.

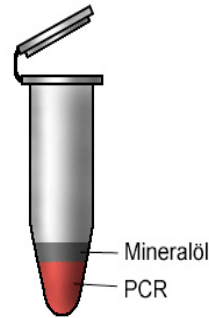
Für die **Reverse Transkription** wurde 1 µg der extrahierten RNS mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 20 µl eingestellt und bei 75°C für 5 Minuten lang erhitzt, um die RNS zu denaturieren. Dann wurde der Ansatz anzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der abgekühlte Ansatz zu einem Reaktionsgemisch gegeben. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 8µl RT-Puffer (5x)
  - 4µl 10x DTT (0,1M)
  - 2µl Hexamere (Konzentration 100 pmol/µl)
  - 3µl 10 mM dNTPs
  - 0,5 µl RNAsin
  - 2µl Superscript<sup>TM</sup> (Reverse Transkriptase)
- Σ = 40 µl

Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt, auf Eis gestellt und nochmals anzentrifugiert. Nach Zugabe von 60µl dH<sub>2</sub>O wurde der Ansatz bei -20°C aliquotiert eingefroren.

Für die ***Polymerase chain reaction*** wurden 10µg cDNA dann zu einem Reaktionsgemisch gegeben, welches sich wie folgt zusammensetzte:

- 5 µl 10xPCR-Puffer
  - 8 µl dNTPs (1,25mM)
  - 2 µl Hin-Primer (10 pmol/µl)
  - 2 µl Rück-Primer (10 pmol/µl)
  - 0,5 µl Taq-Polymerase
  - 22 µl dH<sub>2</sub>O
- $\Sigma = 50 \mu\text{l}$



**Abb. 5:** Schematische Abbildung des Ansatzes mit Mineralöl bedeckt

Bestandteile des *10xPCR-Puffers*:

- 500mM KCL
- 200mM Tris HCL, pH 8,3
- 15mM MgCl<sub>2</sub>

Als Hin- und Rück-Primer wurden folgende Primer verwendet:

- CRLR1: **5'GAC ATC CAG CAA GCA AGC AAC AGA-3'**
- CRLR2: **5'CAA TGC CAA GCA ATG GCA CC-3'**

entsprechend den Nukleotiden 892-911 und 1577-1596 der menschlichen cDNS.

Dieser Ansatz wurde mit 60µl Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten des Ansatzes zu verhindern und um eine Kontamination zu vermeiden (s. Abb. 6). Die CRLR-cDNS wurde dann in 30 PCR-Zyklen amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind wie folgt:

95°C	60 Sekunden	} 30x
55°C	60 Sekunden	
72°C	120 Sekunden	
72°C	10 Minuten	

Bei 95°C sollte die in der RT entstandene cDNS innerhalb von 60sek vollständig denaturiert werden, um nach Abkühlung das Anlagern der Primer an die Matrize zu ermöglichen. Hierfür wurde die Temperatur in Anlehnung an die Hybridisierungstemperatur der Oligonucleotidprimer für weitere 60 sek auf 55°C gesenkt. Der letzte Schritt im Zyklus besteht in der Verlängerung der Primer durch die hitzestabile *Taq-DNS-Polymerase*. Die optimale Temperatur für die *Taq-Polymerase* liegt bei 72°C. Diese Temperatur wurde, entsprechend der Länge des Amplikons, 120sek beibehalten und anschließend der nächste Zyklus begonnen. Insgesamt wurden 30 PCR-Zyklen durchgeführt.

Die für die PCR erforderlichen Temperaturen müssen möglichst exakt eingehalten werden. Zu hohe Temperaturen können bei der PCR zu einer Beschädigung der DNS führen, was wiederum den Einbau falscher Nucleotide zur Folge haben kann. Um die Temperaturen während der Zyklen zu optimieren, wurde ein programmierbarer Thermocycler eingesetzt. Da es sich bei der PCR um eine sehr empfindliche Methode handelt und es leicht zu einer DNS-Kontamination kommen kann, wurde an einem gesonderten Arbeitsplatz gearbeitet, es wurden Filterspitzen und Latexhandschuhe benutzt und bei der Analyse ein PCR-Ansatz ohne das Template als Negativkontrolle mitgeführt.

#### **2.1.4 Nachweis der DNS**

Um die bei der PCR erhaltenen Produkte zu analysieren, wurden jeweils 10µl des Aliquots entnommen und auf einem 1 % Agarosegel analysiert. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte auf Agarosegel in TBE-Puffer (100 Volt für 30 Minuten). Als Molekulargewichtsstandard wurde eine handelsübliche 1 kb-DNS-Leiter verwendet (Invitrogen). Das Gel wurde anschließend mit EtBr. gefärbt und unter UV-Licht (302nm) betrachtet und fotografiert.

## 2.2 Histologischer Nachweis des CRLR in Hirntumorgewebe

Der Nachweis des CRLR auf Protein-Ebene wurde im zweiten Teil dieser Arbeit erbracht. Hierzu diente aus neurochirurgischen Routineoperationen stammendes Tumorgewebe, das in Paraffinblöcken eingebettet vorlag. Eine Einteilung nach histologischer Wertigkeit wurde durch das Neuropathologische Institut der Philipps-Universität Marburg unter Prof. Mennel vorgenommen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verwendeten Proben.

Diagnose	Anzahl
Pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO II°)	1
Niedergradige Astrozytome (WHO II°)	6
Fibrilläre Astrozytome (WHO II°)	2
Gemistozytisches Astrozytom (WHO II°)	1
Anaplastische Astrozytome (WHO III°)	10
Glioblastome (WHO IV°)	24

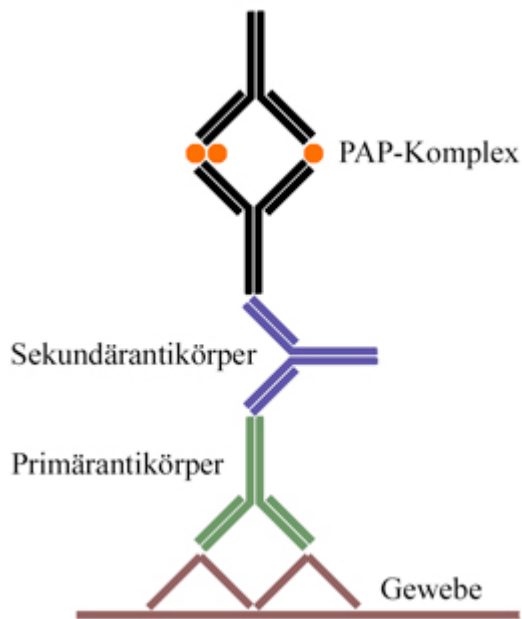
**Tabelle 2:** Tabellarische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten nach gestellter Diagnose

Im nächsten Schritt wurden die Einbettungsmedien entfernt, da diese eine unspezifische Hintergrundfärbung und eine Inhibition der spezifischen Färbung bewirken können.

**Positiv- und Negativ-Kontrollen** wurden zusammen mit dem Präparat durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Färbetechnik zu sichern. Als Positiv-Kontrollen diente in dieser Arbeit das in jedem Präparat enthaltene Gefäßendothel von Arteriolen, welches sich, wie schon beschrieben, in jedem Fall stark CRLR-positiv zeigen sollte. Auch die Intensität der Anfärbung ließ sich durch den direkten Vergleich mit dem Endothel sehr gut einschätzen.

Als **Färbemethode** wurde die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP) gewählt. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode, bei der es zu einer Bindung eines unkonjugierten Antikörpers an das Antigen im Präparat kommt. Zur Lokalisation der Anlagerung wird ein Peroxidase-konjugierter zweiter Antikörper gebraucht, der an den ersten Antikörper bindet. Dann wird ein Substrat zugeführt, um die Reaktion zu lokalisieren. Es werden also drei Reagenzien gebraucht: Ein Primärantikörper, ein Sekundärantikörper sowie der PAP-Komplex, welcher aus dem Enzym Peroxidase und einem Antikörper gegen Peroxi-

dase besteht. Das Enzym Peroxidase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.



*Abb.6: Schematische Darstellung der Bestandteile bei der PAP-Methode*

Als **Primärantikörper** diente ein im Physiologischen Institut der Philipps-Universität Marburg entwickelter Antikörper, der sich gegen den CRLR-Rezeptor richtet. Es handelt sich dabei um einen im Kaninchen (Rabbit) entwickelten Antikörper gegen die synthetische, humane CRLR-Sequenz, der durch Injektion des humanen Antigens erzeugt wird. Die Herstellung des Antikörpers erfolgte mittels Konjugation der humanen CRLR-Sequenz mit Thyroglobulin und Mischung mit Freundschens Adjuvans. Da das Antiserum MR 567 die besten immunhistochemischen Resultate gezeigt hatte, erfolgte dessen Verwendung bei der immunhistochemischen Anfärbung.

### ***2.2.1 Präparatvorbereitung***

Die Herstellung der Präparate erfolgte sofern nicht abweichend beschrieben bei Raumtemperatur. Das in Form von Paraffinblöcken routinefixiert vorliegende Tumormaterial wurde zunächst unter Verwendung eines Mikrotoms mit einer Schichtdicke von 4 µm zu Schnittpreparaten verarbeitet, welche auf Objektträger aufgebracht wurden. Anschließend erfolgte das Entparaffinieren 10 Minuten lang in Xylol und die Rehydratierung in einer absteigenden Alkoholreihe in üblicher Weise, dann die Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung mit einem Wasserstoffperoxydgemisch (1ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 100 ml Methanol) für 20 Minuten. Darauf folgte das Spülen der Präparate mit PBS und fünfminütiges Einlegen in ein Pufferbad. Die Präparate wurden in Citratpuffer für 10 Minuten in der Mikrowelle erhitzt um durch die Fixierung maskiertes Antigen für den Antikörper zugänglich zu machen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde nach Herausnehmen aus dem Pufferbad um den Schnitt herum entfernt. Zur Abschirmung von unspezifischen Bindungen erfolgte die Zugabe von ca. 100 µl FBS (fetales bovines Serum) auf jedes Präparat mit einer Einwirkdauer von 20 Minuten. Das Rinderserum wurde dabei im Verhältnis 1:5 mit PBS-Puffer verdünnt.

### ***2.2.2 Zugabe der Antikörper***

Es folgte nun das Auftragen des Primärantikörpers gegen den CRLR, welchem vorher jeweils ca. 100 µl 1 prozentigem FBS beigefügt wurde. Nach einer 45-minütigen Einwirkzeit wurde mit PBS-Puffer gespült.

Der Sekundärantikörper gegen den CRLR wurde zugegeben und nach 30 Minuten mit PBS-Puffer gespült.

Den Präparaten wurde der PAP-Komplex zugefügt und nach 30 minütiger Einwirkzeit erneut mit PBS-Puffer gespült.

Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg).

### 2.2.3 Anfärbung

Als chromogene Substratlösung wurde zunächst Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Dazu wurde 1 ml DAB mit 19 ml PBS-Puffer versetzt. Dieser Mischung wurden 300 µl 30% Wasserstoffperoxyd beigelegt und anschließend 10 Minuten unter dem Abzug inkubiert.

### 2.2.4 Evaluation

Zur Auswertung der Immunpositivität wurde die Anzahl der CRLR-positiven Zellen sowie die Anzahl der für den Astrozytenmarker GFAP positiven Zellen untersucht. Die Zähleinheit bestand dabei aus einem quadratischen, unterteilten, mikroskopischen Okularzählfeld mit 10 x 10 Feldern (10 x 10 µm) und mit einem Mikroskop der Firma Leitz, Wetzlar. Erfasst wurde zudem die Anzahl aller im Zählfeld vorhandenen Zellen ausser den Endothelzellen.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde der durch W. Remmele und H. E. Stegner entwickelte Immunoreactive Score (IRS) verwendet. Die Einteilung des Färbegrades erfolgte dabei nach dem folgenden Schema:

SI-Einteilung	PP-Einteilung	Hypothetischer Maximalwert
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	3 x 3 = 9
1 = schwache Färbereaktion	1 = <10 Prozent positive Zellen	
2 = mäßige Färbereaktion	2 = 10-50 Prozent positive Zellen	
3 = starke Färbereaktion	3 = >50 Prozent positive Zellen	

**Tabelle 3:** Schematische Darstellung des Immunoreactive Score

SI entspricht dabei der Färbeintensität (*Staining Intensity*), PP dem Prozentsatz der positiven Zellen. Der SI wird dabei subjektiv geschätzt, für seine Ermittlung ist der vorherrschende SI-Grad maßgebend. Zur richtigen Angabe des SI ist der Vergleich mit der im

gleichen Färbegang mitgeführten Kontrollen unerlässlich. In dieser Arbeit wurde hierzu das in jedem Präparat vorhandene und stets positive Gefäßendothel herangezogen.

Das Zählen erfolgte an zehn unterschiedlichen Stellen pro Präparat, wobei vitales Tumorgewebe (keine Nekrosen) aufgesucht wurde. Zudem wurde bei jeder der zehn Zählungen für GFAP und CRLR möglichst die gleiche Stelle innerhalb des Tumors aufgesucht, wofür aufeinanderfolgende Schnitte benutzt wurden und die enthaltenen Gefäßkonfigurationen als Vergleichsmerkmal dienten.

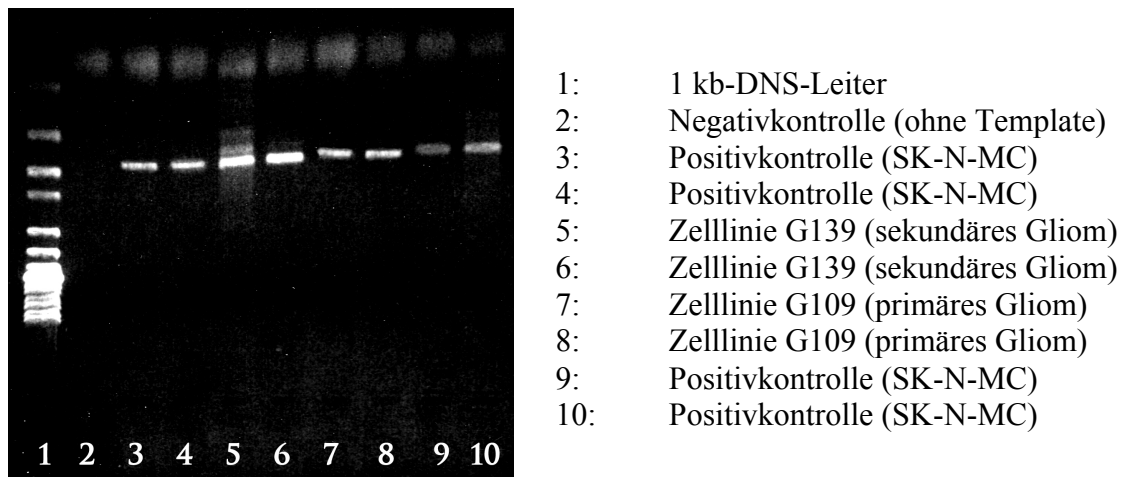
Die klinische Klassifikation des Tumorgewebes erfolgte durch Prof. H. D. Mennel, zum Zeitpunkt der dargestellten Experimente Leiter der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Marburg, in Anlehnung an die Rubriken und Gradierungsschemen der zu diesem Zeitpunkt aktuellsten Ausgabe der *WHO brain tumour classification*.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis des CRLR-Rezeptors auf m-RNS-Ebene

Die m-RNS Expression des CRLRs konnte zunächst mittels RT-PCR in zwei unterschiedlichen Gliomzelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. 7). Bei der Zelllinie G109 handelt es sich um eine Zelllinie aus primären Gliomen, bei G139 aus sekundären Gliomen.



**Abb. 7: Invertierte UV-Licht-Photographie des 1-dimensionalen Agarosegels.**

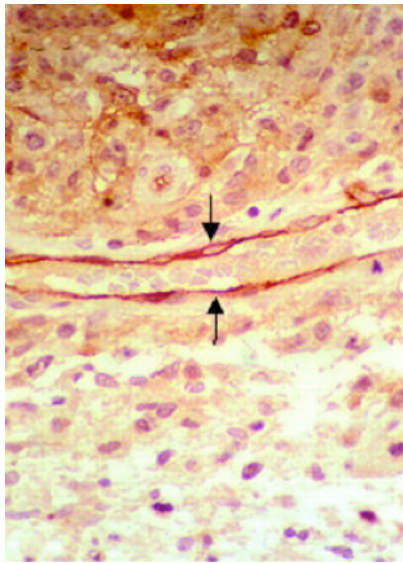
*Zur Analyse der bei der PCR erhaltenen Produkte wurden jeweils 10µl-Aliquot entnommen und auf 1 Prozent Agarosegel analysiert. Das Gel wurde anschließend an die Elektrophorese unter UV-Licht von 302nm betrachtet und fotografiert.*

## **3.2 Immunhistochemischer Nachweis des CRL-Rezeptors**

### ***3.2.1 Nachweis des CRLRs in Blutgefäßen von Gliomen***

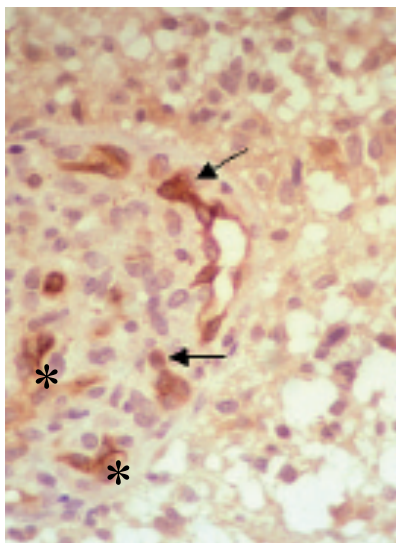
Gliome zunehmender Malignität gehen mit einer wachsenden Zahl von Blutgefäßen einher. Dabei weisen die Blutgefäße teils eine pathologische, teils eine normale Morphologie auf. In den Präparaten zeigten sich vielfältige Arten von Gefäßen, die eine positive Immunreaktion auf CRLR aufwiesen.

In niedergradigen Astrozytomen (WHO °II) zeigten sich größere Venen CRLR-positiv, welche sich von den typischerweise in diesen Tumoren vorkommenden venösen Vakuolen hervorhoben (s. Abb. 8). In malignen Gliomen (WHO °III und °IV) beginnt das Gefäßwachstum mit der Ausbildung von Endothel, welches sich durch eine doppelte Lage von Endothelzellen mit Zeichen von Mitosen in den Präparaten zeigte und ebenso regelmäßig eine CRLR-Positivität aufwies. Girlandenförmige Kapillaren und angiomatöse Gefäßformationen, welche typisch für maligne Gliome sind, zeigten eine deutliche Immunreaktion auf CRLR, wobei angrenzende Tumorzellen nur eine leichte Reaktion zeigten (s. Abb. 9 + 10). Trotz der eindeutigen Positivität des umgebenden Tumorgewebes ließen sich die Blutgefäße eindeutig vom umgebenden Tumorgewebe abgrenzen, da sich die Anfärbung auf die Endothelwand, im Gegensatz zu der diese umgebenden Gefäßwand, beschränkte (s. Abb. 11).



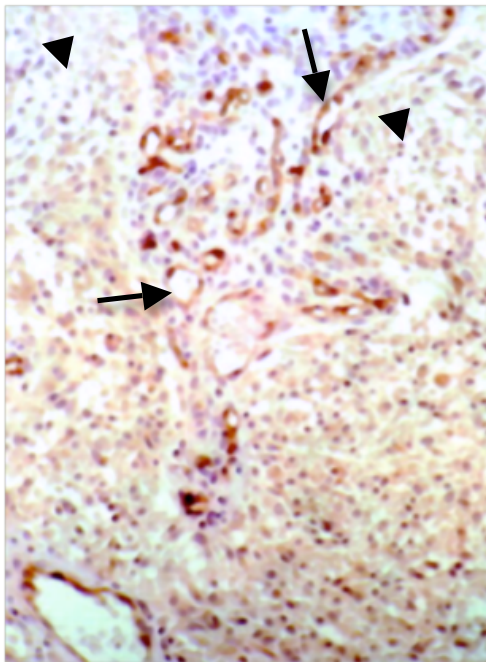
**Abb. 8 Lokalisation von CRLR im Gliom-Gewebe**

Auf der Abbildung dargestellt ist ein Blutgefäß (Pfeile), welche sich in einem niedergradigeren Anteil des untersuchten Glioms befindet. Die Endothelbegrenzung weist eine ausgeprägte immunhistochemische CRLR-Anfärbung auf. Beachtenswert sind in der Abbildung zudem die astrozytären Ausläufer im oberen Teil des Bildes, welche sich ebenfalls immunhistochemisch positiv darstellen. (Originalvergrößerung x500)



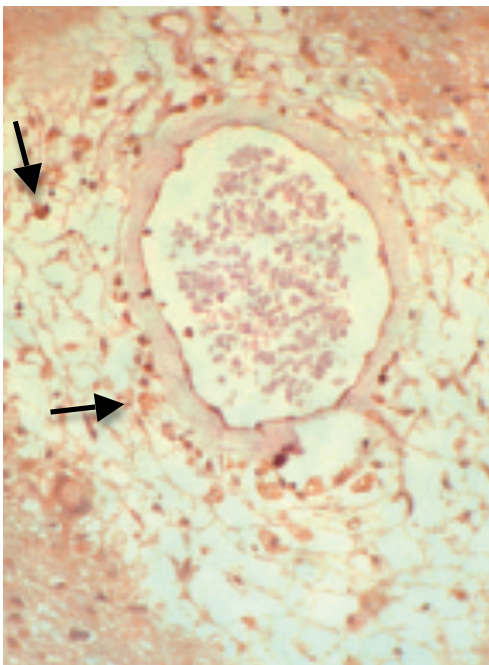
**Abb. 9 Lokalisation von CRLR in der Gefäßumgebung im Gliom-Gewebe**

Es zeigt sich hier ein kleines Gefäßkonglomerat innerhalb eines Glioms. Die Pfeile deuten auf Zellen, die das Calcitonin receptor-like Receptor Protein exprimieren. Diese Zellen haben die ursprüngliche Endothelformation verlassen. Es scheint sich somit um Endothelzellen im Stadium der Migration bzw. der Endothelproliferationsphase zu handeln. Auch hier zeigen benachbarte Zellen ebenfalls eine positive Anfärbung (\*). (Originalvergrößerung x500)



**Abb. 10 Nachweis von CRLR in Proliferationszonen**

*Die Abbildung zeigt für Glioblastome typische, girlandenförmig angeordnete Kapillaren mit einer großen Anzahl verstreuter Kapillarlumina (Pfeile), welche eine positive CRLR-Anfärbung präsentieren Und Endothelproliferate darstellen. Ebenfalls sichtbar sind CRLR-negative Bereiche(▲), welche zu Bereichen der Tumorphroliferationszonen im Bereich der Gefäßwände gehören. (Orginalvergrößerung x250)*



**Abb. 11 Nachweis von CRLR in der Gefäßumgebung**

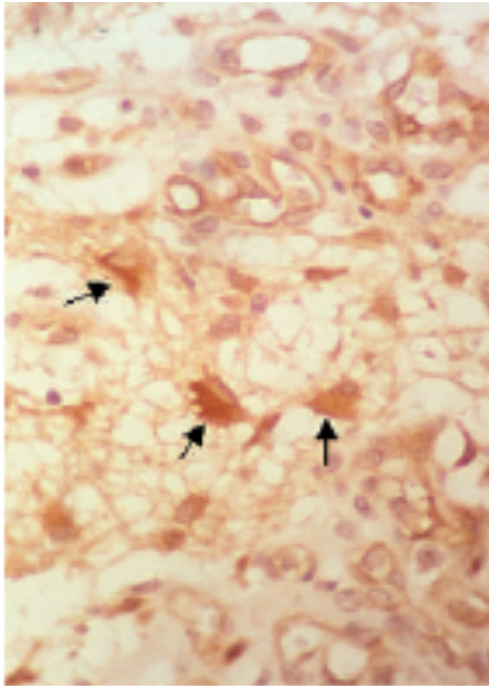
*Es zeigen sich große Gefäße mit kleineren, begleitenden oder abzweigenden, sekundären Gefäßen. Hier zeigt sich die das Endothel umgebende Tunica media CRLR-negativ. Gut sichtbar sind jedoch einige vereinzelte, verstreut liegende Zellen in der Umgebung der Gefäßwand, welche eine positive Anfärbung aufweisen und durch die negativen Anteile der Gefäßwand eindeutig vom Endothel zu unterscheiden sind. (Orginalvergrößerung x500)*

### **3.2.2 Nachweis des CRLRs in Tumorzellen von Gliomen**

Es zeigte sich eine inkonsistente Anfärbung der Tumorzellen in den untersuchten Präparaten. Es ließ sich jedoch in allen Präparaten das CRLR-Protein nachweisen. Die Immunreaktion zeigte sich klar und umschrieben in einzelnen Zellen, regelmäßig aber auch in größeren Zellkonglomeraten. Zudem ließen sich unterschiedliche Färbemuster der Immunreaktivität auf CRLR in den Tumorzellen nachweisen. Einzelne Zellen in einer unauffälligen Umgebung zeigten zytoplasmatische Auswüchse und dabei die für Astrozyten typische Form (s. Abb. 12). Sie entsprachen dabei dem protoplasmatischen Subtyp, welcher sich üblicherweise in reaktiven und tumorösen Umgebungen findet. Bevorzugt fanden sich diese gehäuft in direkter Umgebung von Gefäßen oder in geringem Abstand zu diesen.

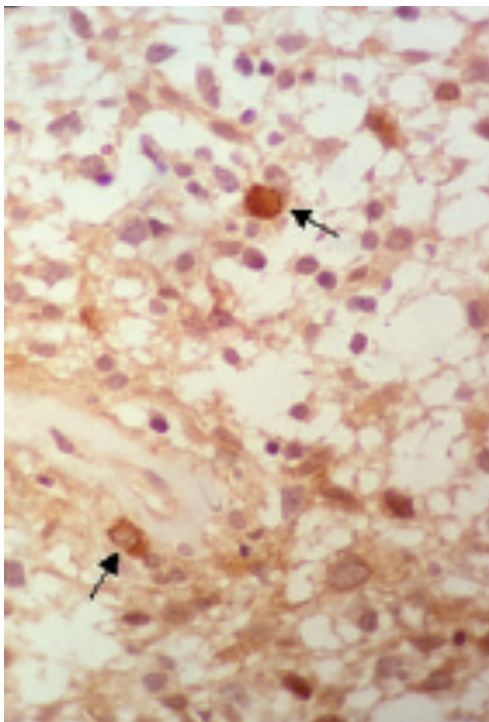
Einige der gebläht wirkenden Gemistozyten zeigten eine intensive CRLR-Positivität. Sie traten dabei in kleinen Konglomeraten auf, ähnlich der Anordnung anderer multipolarer Tumorzellen, was als ein Hinweis auf fokale Zellvermehrung aufgefasst werden kann.

Eine weitere Erscheinungsform der Expression zeigte sich in losen Netzwerken von niedergradigen fibrillären Astrozytomen; hier zeigten sich eine sehr viel dichtere und bipolare Anordnung der anaplastischen Zellen sowie die vielfältigen zellulären Morphologiemuster von hochmalignen glialen Tumorzellen in der Umgebung pathologischer Gefäße (s. Abb. 14). Entsprechende Kofärbungen mit GFAP + CRLR würden an dieser Stelle einen eindeutigeren Nachweis erbringen, wurden in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.



**Abb. 12: gefäßnahe positive Zellen**

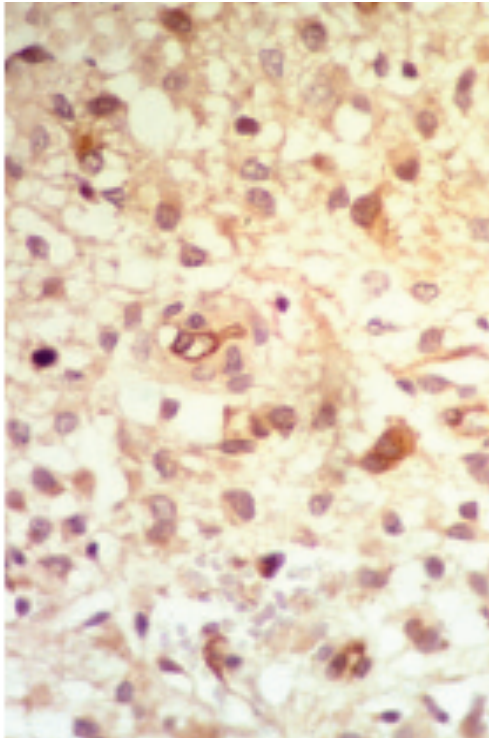
*Mit Pfeilen markiert sind drei Calcitonin receptor-like Receptor positive Zellen, welche die für Astrozyten typische sternförmige Struktur aufweisen und am ehesten Astrozytomzellen entsprechen. Diesen benachbart zeigen sich im oberen und unteren Drittel der Abbildung Felder, in welchen eine erhöhte vaskuläre Proliferation sichtbar ist. (Originalvergrößerung x850)*



**Abb. 13: gefäßferne positive Zellen**

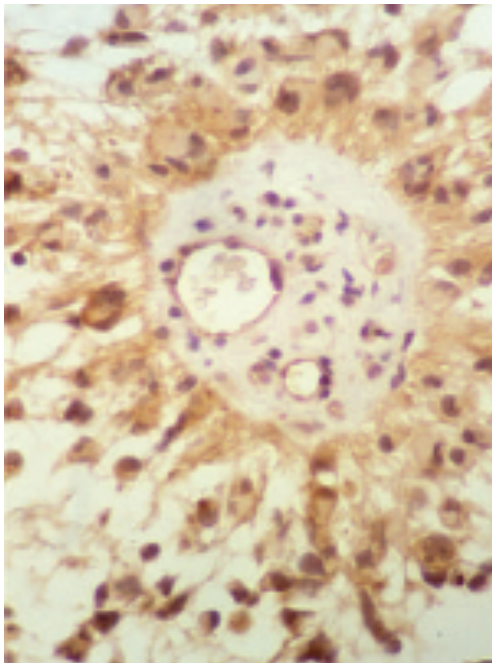
*Der untere Pfeil weist auf eine Zelle, die sich direkt an die Wand eines Gefäßes anlegt. Eine andere stark CRLR-positiver Zelle befindet sich etwas entfernt vom Gefäß (oberer Pfeil). Weitere verstreute und immunhistochemisch positive Zellen sind innerhalb des lockeren Tumorverbandes sichtbar. (Originalvergrößerung x850)*





**Abb. 14: Tumorzellen in einem Astrozytom**

*Schnitt aus einem fibrillären Astrozytom. Es zeigen sich verstreute, CRLR-positive Astrozyten im losen Netzwerk des Tumors. Ebenso sind immunhistochemisch positive Endothelien kleiner Gefäße zu erkennen. (Originalvergrößerung x 500)*

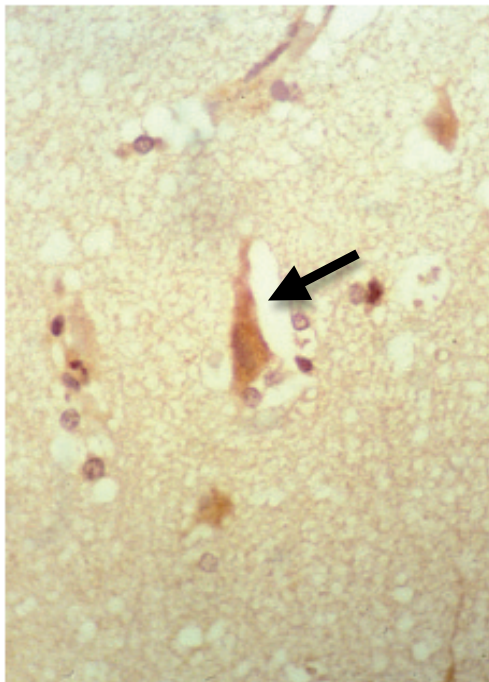


**Abb. 15: Gefäß in einem Glioblastom**

*Die Abbildung zeigt ein pathologisches Tumorgefäß innerhalb eines Glioblastoms. Das Gefäß wird von zahlreichen Tumorzellen umschlossen, welche sich, erneut gut abgegrenzt durch die fibrösen Anteile der Gefäßwand, positiv für CRLR darstellen. Im Gefäß selber sind mehrere Lumina, eingefasst von ebenfalls positivem Endothel, sichtbar. Zu beachten ist zudem, dass sich sämtliche perivaskulären Astrozyten positiv darstellen. (Originalvergrößerung x850)*

### **3.2.3 Nachweis des CRLRs in Neuronen innerhalb von Gliomen**

Kortikale Neurone, vermutlich im Tumor selber eingeschlossen, und insbesondere deren Perikaria, wiesen vereinzelt aber intensiv CRLR-Immunoreaktivität auf (s. Abb. 16). Die meisten von ihnen zeigten einen veränderten Aufbau, vermutlich als Resultat auf den Einfluss durch das anliegende Tumorgewebe. CRLR-positive Neurone konnten vor allem in tieferen kortikalen Schichten beobachtet werden.



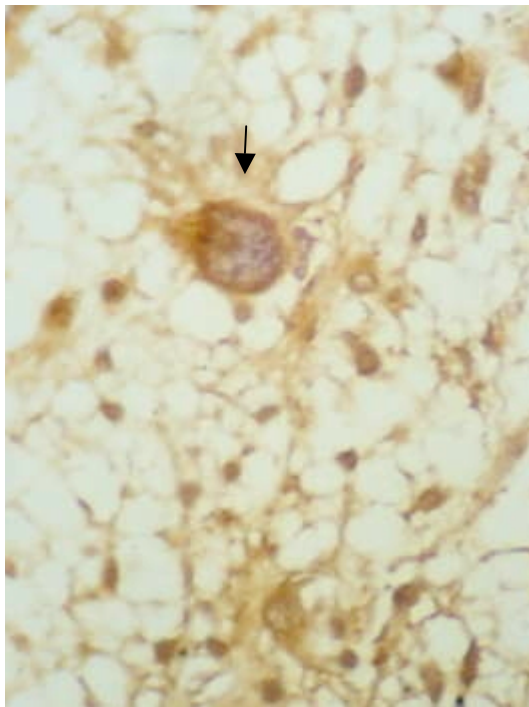
**Abb. 16: CRLR-positives Neuron**

*In der Mitte der Abbildung zeigt sich ein einzelnes Neuron, welches ein Schrumpffartefakt (Pfeil), das auf eine Hypoxie schließen lässt, und eine ausgeprägte positive Anfärbung aufweist. (Originalvergrößerung x500)*



### 3.2.4 Zelluläre Lokalisation des CRLRs

Die positiven Anfärbungen zeigten sich in sämtlichen Fällen im Bereich des perinukleären Zytoplasmas. Das galt sowohl für die neuronalen Perikaria als auch für die Endothelzellen und die Astrozyten. Dabei zeigten die Astrozyten keine konstante Intensität der Immunfärbung innerhalb einzelner Zellen. Einige Riesen-Tumorzellen wiesen eine deutliche periphere Färbung auf, wobei ihr protoplasmatisches Zentrum sich negativ zeigte (s. Abb. 17). Gemistozyten zeigten sich sowohl GFAP- als auch CRLR-positiv (s. Abb. 18 + 19).



**Abb. 17: Tumorzelle in Glioblastom**

*Die Abbildung zeigt eine Riesentumorzelle in einem lockeren Verband aus Zellen in einem Glioblastom. Zu erkennen ist die periphere Anfärbung der Zelle, wobei das protoplasmatische Zentrum sich CRLR-negativ darstellt. (Originalvergrößerung x850)*



**Abb. 18 (CRLR)**



**Abb. 19 (GFAP)**

**Die Abbildungen zeigen vergleichende Schnitte in einem Glioblastom.** Es zeigt sich ein Blutgefäß mit Anteilen des umgebenden Tumorgewebes. In Abbildung 18 erfolgte die Anfärbung des CRLR, in Abbildung 19 die des GFAP.

Das Gefäßendothel zeigt sich CRLR-positiv und GFAP-negativ, was auf die nicht-astrozytäre Gewebsentität hinweist (Pfeile a).

Die das Endothel umgebende fibröse Gefäßwand zeigt sich sowohl CRLR- als auch GFAP-negativ (Pfeile b).

Der aufgelockert wirkende äußere Teil der Gefäßwand weist vereinzelte CRLR-positive Astrozyten auf (Pfeile c), zeigt sich insgesamt jedoch nicht astrozytischen Ursprungs. Im Gewebe befinden sich hier zahlreiche CRLR-positive Zellen.

Das umgebende Tumorgewebe zeigt sich, soweit beurteilbar, sowohl GFAP als auch CRLR stark positiv (d). Eine dem Gefäß anliegende Riesentumorzelle (Pfeil) weist die schon beschriebene und wiederholt zu beobachtende periphere Anfärbung mit zentraler Aussparung auf. Der astrozytäre Ursprung zeigt sich durch die deutliche GFAP-Positivität. (Originalvergrößerung x500)

### 3.2.5 *Morphometrie und Statistische Ergebnisse*

Die Zählungen erfolgten in Präparaten aus Tumorgewebe ohne Normalhirn und Nekrosen. Gezählt wurden sämtliche im Präparat enthaltene Zellen ohne Endothelzellen, sowie die Anzahl der CRLR- bzw. GFAP-positiven Zellen. Es erfolgten zehn Zählungen pro Präparat jeweils für GFAP und CRLR, woraus für jedes Präparat der Mittelwert berechnet wurde.

CRLR-positive Zellen fanden sich in sämtlichen Präparaten. Die für jedes Präparat errechneten Mittelwerte reichten dabei von 1,01 bis 93,90 Prozent der Gesamtzellen.

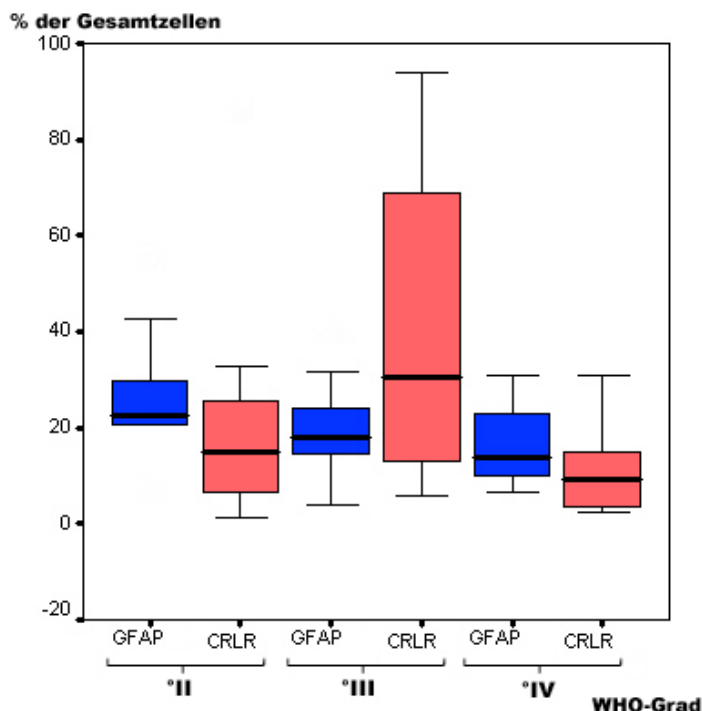
Auch GFAP-positive Zellen fanden sich in sämtlichen Präparaten. Die hier errechneten Mittelwerte für jedes Präparat reichten von 3,47 bis 54,67 Prozent der Gesamtzellen.

In der Verteilung zeigten sich die stärkste Expression des CRLR in Präparaten vom WHO-Grad III, gefolgt von den Präparaten WHO-Grad II und die schwächste Expression in WHO-Grad IV. Die Varianz zeigte sich am höchsten in den Präparaten WHO-Grad III (=10,4).

In der Verteilung der GFAP-positiven Zellen zeigte sich eine Abnahme der relativen Zahl positiver Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl mit steigendem Malignitätsgrad. Auch hier zeigte sich die größte Varianz in den Präparaten vom WHO-Grad III, jedoch im Vergleich zum CRLR wesentlich geringer.

Das nachfolgende Diagramm (Abb. 20) gibt eine Übersicht über den Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen jeweils im Vergleich CRLR mit GFAP und abhängig vom Malignitätsgrad der Präparate. Die Färbeintensität der Präparate wurde hierbei nicht berücksichtigt. Tabelle 4 zeigt die weitere Auswertung der jeweils positiven Zellen mit Varianz und Standardabweichung sowie die Untersuchung der Korrelation GFAP- und CRLR-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen WHO-Grade. Innerhalb der WHO-Grade kann hier keine Korrelation der positiven Zellen zur Zelldichte aufgezeigt werden.

## Übersicht der Gesamtverteilung



**Abb. 20:** Das Diagramm zeigt den Anteil der GFAP- und CRLR-positiven Zellen in den untersuchten Präparaten abhängig vom WHO-Grad des vorliegenden Tumors im Gesamtvergleich. Es zeigt sich eine Abnahme der GFAP-positiven Zellen bei steigendem Malignitätsgrad. Eine positive oder negative Korrelation der CRLR-positiven Zellen abhängig vom WHO-Grad besteht nicht. Untersucht wurde jeweils die gemittelte Anzahl der positiven Zellen in den einzelnen Zählungen (zehn Zählungen pro Präparat) sowie aller Präparate abhängig vom WHO-Grad.

### Analyse der Zelldichte positiver Zellen

	WHO °II		WHO °III		WHO °IV	
Färbung	GFAP	CRLR	GFAP	CRLR	GFAP	CRLR
Gesamtzellzahl	123,3	114,3	135,9	128,0	167,4	157,1
Mittelwert positiver Zellen (% der Gesamtzellen)	24,84	22,32	19,83	41,80	14,77	9,15
Korrelationskoeffizient	0,29		0,06		0,34	
Standardabweichung	14,84	24,21	10,17	45,66	9,50	8,61

**Tabelle 4:** Analyse der Zählungen von Tumorzellen in den untersuchten Tumoren (Mittelwerte) ohne Berücksichtigung der allgemeinen Färbintensität. Hier zeigt sich keine Korrelation der Zelldichte im Vergleich der GFAP- und CRLR-positiven Zellen. Es zeigt sich eine Abnahme der Dichte GFAP-positiver Zellen in Abhängigkeit des WHO-Grades.

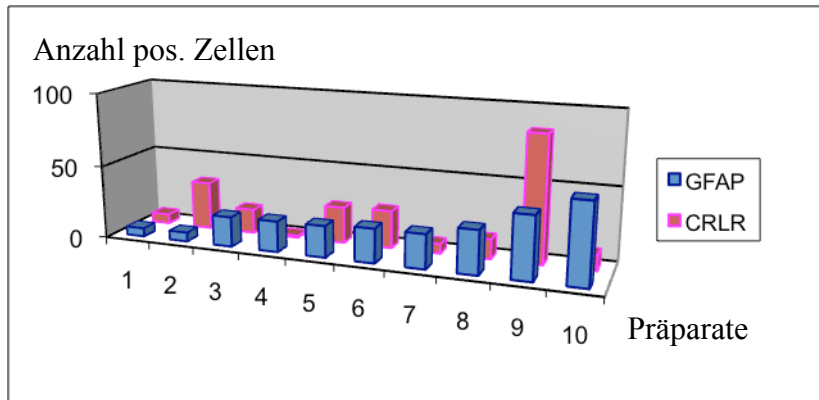
## Analyse der Immunreaktivität durch Anwendung des IRS

Um den möglichen Fehlerfaktor verursacht durch unterschiedliche Färbeintensitäten der einzelnen Präparate zu minimieren, wurde der Immunoreactive Score (IRS) auf die Präparate angewendet und die hieraus resultierenden Ergebnisse analysiert. Die Ergebnisse zeigten dabei Unterschiede zur Auswertung der Positivitäten ohne Berücksichtigung der Färbeintensität. Tabelle 5 zeigt die Auswertung der Ergebnisse aus dem IRS im Vergleich GFAP mit CRLR und in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden WHO-Grad. Die in Abbildung 23 und Tabelle 4 gezeigte negative Korrelation der GFAP-positiven Zellen mit dem WHO-Grad kann hier nicht mehr nachgewiesen werden. Eine negative Korrelation des IRS zeigt sich hier jedoch im Vergleich GFAP- und CRLR-positiver Zellen innerhalb der Präparate vom WHO °II, welche signifikant ist. Dieses bedeutet eine Abnahme CRLR-positiver Zellen bei einer Zunahme GFAP-positiver Zellen.

Analyse der Immunreaktivität mittels IRS						
	WHO °II		WHO °III		WHO °IV	
Färbung	GFAP	CRLR	GFAP	CRLR	GFAP	CRLR
Mittelwert des IRS	2,8	2,3	2,2	3,2	4,29	1,7
Korrelationskoeffizient	-0,83 (p=0,003)		0,3 (p=0,378)		0,08 (p=0,880)	
Standardabweichung	0,42	1,57	0,79	3,22	1,99	1,71

**Tabelle 5:** Analyse der Zählungen nach Anwendung des Immunoreactive Scores (IRS). Die Verteilung entspricht im Wesentlichen der Analyse der Zelldichte positiver Zellen (s. Tabelle 4). Es zeigt sich hier jedoch eine negative Korrelation der Häufigkeiten positiver Zellen in Tumoren vom WHO °II GFAP gegen CRLR, welche signifikant ist (p=0,003). Dieses bedeutet eine signifikante Abnahme CRLR-positiver Zellen bei einer Zunahme GFAP-positiver Zellen. Zudem zeigt sich hier eine deutlich höhere Immunoreaktivität des GFAP in Präparaten vom WHO °IV. Eine negative Korrelation des GFAP hinsichtlich des WHO-Grades ist hier nicht nachweisbar (Korrelationskoeffizient GFAP - WHO-Grad = 0,69).

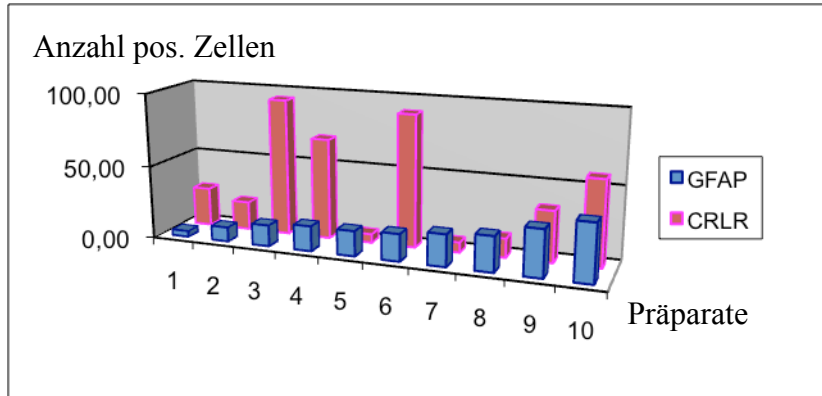
## Präparate vom WHO Grad II



**Abb. 21:** Das Diagramm zeigt die Häufigkeitsverteilung von CRLR-positiven Zellen in den untersuchten Tumoren vom WHO-Grad II in Abhängigkeit von den GFAP-positiven Zellen. Es zeigt sich keine Korrelation bzw. Regression in der Häufigkeitsverteilung. Der Darstellung liegt jeweils die gemittelte Anzahl der positiven Zellen der einzelnen Präparate zugrunde. (Korrelationskoeffizient GFAP-CRLR = 0,29)

Der Mittelwert der CRLR-positiven Zellen in den Präparaten vom WHO-Grad II beträgt 22,32 Prozent bei einer Standardabweichung von 24,21. Die Mittelwerte für das jeweilige Präparat reichen dabei von 1,36 bis 85,3 Prozent.

### Präparate vom WHO-Grad III

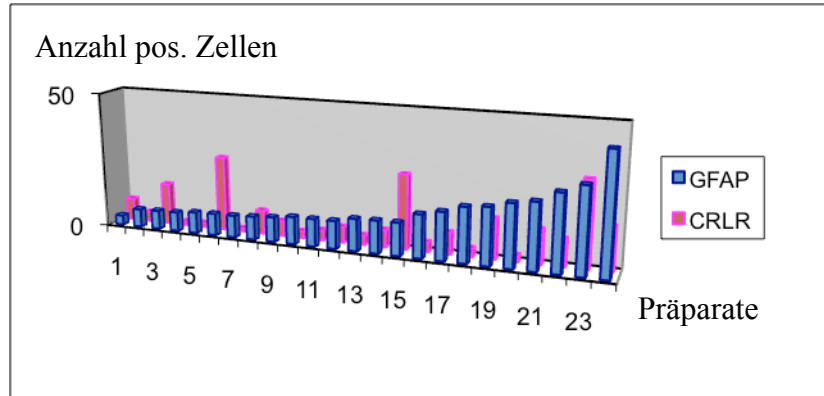


**Abb. 22:** Das Diagramm zeigt die Häufigkeitsverteilung von CRLR-positiven Zellen in den untersuchten Tumoren vom WHO-Grad III in Abhängigkeit von den GFAP-positiven Zellen. Es zeigt sich auch hier keine Korrelation bzw. Regression in der Häufigkeitsverteilung. Der Darstellung liegt jeweils die gemittelte Anzahl der positiven Zellen der einzelnen Präparate zugrunde.

(Korrelationskoeffizient GFAP-CRLR = 0,06)

Der Mittelwert der CRLR-positiven Zellen in den Präparaten vom WHO-Grad III beträgt 41,8 Prozent bei einer Standardabweichung von 33,65. Die Mittelwerte für das jeweilige Präparat reichen dabei von 5,94 bis 93,90 Prozent.

## Präparate vom WHO-Grad IV



**Abb. 23:** Das Diagramm zeigt die Häufigkeitsverteilung von CRLR-positiven Zellen in den untersuchten Tumoren vom WHO-Grad IV in Abhängigkeit von den GFAP-positiven Zellen. Eine positive oder negative Korrelation in der Häufigkeitsverteilung ist auch hier nicht feststellbar. Der Darstellung liegt jeweils die gemittelte Anzahl der positiven Zellen der einzelnen Präparate zugrunde.  
(Korrelationskoeffizient GFAP-CRLR = 0,34)

Der Mittelwert der CRLR-positiven Zellen in den Präparaten vom WHO-Grad IV beträgt 9,15 Prozent bei einer Standardabweichung von 8,61 Zellen. Die Mittelwerte für das jeweilige Präparat reichen dabei von 1,5 bis 30,75 Prozent.



## Vergleichbarkeit der Stichproben in GFAP- und CRLR-Präparaten

Die Zählungen innerhalb der Präparate erfolgten an möglichst komplementären Stellen, da von einer Inhomogenität der Zelldichte an unterschiedlichen Orten innerhalb eines Tumors ausgegangen werden muss. Um einen direkten Vergleich der Anzahl GFAP-positiver Zellen und CRLR-positiver Zellen durchführen zu können, sollte die jeweilige Zählung möglichst an einer vergleichbaren Stelle erfolgen. Um den Erfolg dieser Maßnahme zu untersuchen, wurde zunächst die Korrelation der Gesamtzellzahl aller Zählungen der GFAP-Präparate als erste Matrix, und die Gesamtzellzahl aller Zählungen der CRLR-Präparate als zweite Matrix anhand gepaarter Stichproben und in Abhängigkeit des WHO-Grades analysiert. Hierbei scheint unter Betrachtung aller Zählungen innerhalb des jeweiligen WHO-Grades eine gute Korrelation zu bestehen, insgesamt variiert also die Zelldichte in den verglichenen Präparaten gemeinsam.

Korrelation der Gesamtzellzahl aller Zählungen GFAP/CRLR			
	WHO °II	WHO °III	WHO °IV
Korrelationskoeffizient	0,974680993	0,972926368	0,976026994

**Tabelle 6:** Die Tabelle zeigt die Korrelation der gepaarten Stichproben aus den GFAP- und CRLR-Präparaten in Abhängigkeit vom jeweiligen WHO-Grad. Die errechneten Korrelationskoeffizienten liegen dabei jeweils über einem Wert von 0,972. Insgesamt scheint somit eine gute Vergleichbarkeit zu bestehen, da die Gesamtzelldichte in den GFAP-Zählungen deutlich mit der Gesamtzelldichte in den CRLR-Zählungen korreliert, was bedeutet, dass diese unabhängig von der absoluten Zellzahl gemeinsam variieren.

Weiterhin wurden die Gesamtzellzahlen innerhalb der Präparate durch Berechnung der Korrelation in den gepaarten Einzelzählungen verglichen, um Hinweise über die Homogenität innerhalb der einzelnen Präparate zu gewinnen. Dabei wurden alle Zellen bis auf Endothelzellen, unabhängig ihrer Immunopositivität oder Immunonegativität betrachtet. Hierbei zeigten sich deutliche Abweichungen der Korrelation innerhalb der einzelnen Präparate. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Analyse der jeweiligen Korrelation dargestellt. Hierzu wurde zunächst die Korrelation GFAP zu CRLR für jedes einzelne Präparat berechnet, und diese dann für alle Präparate des jeweiligen WHO-Grades analysiert. Trotz einiger abweichender Präparate zeigte sich in den Präparaten vom WHO °II und °IV eine gute Korrelation nach Errechnung des Median. Der Median wurde hier statt des Mittelwertes benutzt, um Ausreisser zu eliminieren. In den Präparaten vom WHO °III zeigt sich keine Korrelation der Gesamtzellzahlen, was auf deutliche Unterschiede seitens der Zelldichte in den verglichenen Präparaten (GFAP/CRLR) hinweist.

<b>Korrelationen der Gesamtzellzahlen in den Präparaten GFAP/CRLR</b>			
	<b>WHO °II</b>	<b>WHO °III</b>	<b>WHO °IV</b>
Varianz	0,116	0,176	0,070
Standardabweichung	0,341	0,420	0,265
Median	0,882	0,332	0,941

**Tabelle 7:** In der Tabelle sind Ergebnisse zur Untersuchung der Korrelationskoeffizienten (Gesamtzellzahlen in GFAP- verglichen mit CRLR-Präparaten) der einzelnen Präparate dargestellt. Hierzu wurde zunächst die Korrelation der Zellzahlen in den einzelnen Präparaten untersucht, welche sich in einzelnen Zählungen erheblich voneinander unterscheiden. Deutlich wird dieses durch Betrachtung des Medians aller erhobenen Korrelationskoeffizienten für jedes Präparat im Vergleich mit dem Korrelationskoeffizienten aller Zählungen (s. Tabelle 6). Die beste Korrelation, geringste Varianz und Standardabweichung zeigt sich in den Präparaten vom WHO °IV, die schlechteste Korrelation, höchste Varianz und Standardabweichung in denen vom WHO °III. Zusammengefasst scheint eine gute Vergleichbarkeit GFAP gegen CRLR in den Präparaten vom WHO °IV gegeben, gefolgt von den Präparaten vom WHO °II und eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der Präparate vom WHO °III.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung und Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen das Vorkommen der Calcitonin receptor-like Receptor (CRLR) mRNA in humanen Gliomzelllinien aus primären und sekundären Glioblastomen untersucht. Zum anderen wurde nach Nachweis der mRNA des Rezeptors die Expressionsstärke des CRL-Rezeptors in humanen Gliomen untersucht. Verglichen wurde hierbei die Expressionsstärke in Astrozytomen in Abhängigkeit ihres WHO-Grades. Ein Vergleich erfolgte zudem jeweils entsprechend mit dem sauren Gliafaser-Protein (GFAP). Untersucht werden sollte, ob ein Zusammenhang der Expressionsstärke des Rezeptors mit dem WHO-Grad der Gliome besteht.

#### 4.1.1 CRLR-RNS

Untersucht wurden jeweils eine primäre und eine sekundäre Gliomzelllinie, G 109 und G 139. Es erfolgte zunächst die Isolierung der CRLR-RNS. Nach photometrischer Bestimmung der RNS-Konzentration erfolgte die Transkription der RNS mittels PCR in cDNS. Der Nachweis der DNS erfolgte sodann mittels Elektrophorese im Agarosegel.

Beide Zelllinien zeigten sich CRLR-RNS-positiv. Der Nachweis der CRLR-RNS konnte somit erbracht werden, wodurch sich als weitere Fragestellung das mögliche Vorkommen und die Verteilung des CRLR-Proteins auf Rezeptor-Ebene in humanen Gliomen ergab.

Die Translation der CRLR-RNS geschieht in vivo am Endoplasmatischen Retikulum, wo durch Koexpression und Kopplung an ein RAMP dann eine spezifische Rezeptoreinheit entsteht, welche wiederum mittels Vesikeln zur Zellmembran transportiert wird und dort eine G-Protein gekoppelte, funktionelle Rezeptoreinheit darstellt. Das CRLR-Protein stellt damit einen Grundbaustein für verschiedene funktionelle Rezeptoreinheiten dar. Der CRL-Rezeptor wurde seit seiner Entdeckung in der menschlichen Haut, der menschlichen Kopfhaut, im menschlichen Endothel, in der glatten Gefäßmuskulatur, in menschlichen Hirnarterien, in Neuroblastomzellen sowie in bovinen Aortenzellen, insgesamt also in Geweben

mit ausgeprägter Vaskularisierung, nachgewiesen [102][34]. Da der CRLR erst durch Koexpression und Kopplung an verschiedene RAMPs zu einer spezifischen, funktionellen Rezeptoreinheit wird, muss in diesem Zusammenhang die Wirkung seiner möglichen Liganden beachtet werden. Diese sind Adrenomedullin, CGRP und Intermedin. Das Vorkommen der CRLR-RNS in den Gliomzelllinien weist auf die Teihabe des Rezeptors am Tumorwachstum von Gliomen hin. Hierzu sollte im nächsten Schritt der immunhistochemische Nachweis des Rezeptors in Gliomen unterschiedlicher biologischer Wertigkeit erfolgen, um eine mögliche Dynamik der Expressionsstärke zu untersuchen.

#### **4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis des CRLR-Proteins**

Material für den immunhistochemischen Nachweis des CRLR bildeten bei neurochirurgischen Routineoperationen gewonnene Tumorproben (n=44), welche in Paraffinblöcken konserviert vorlagen. Untersucht wurden Gliome astrozytären Ursprungs vom WHO-Grad II bis IV. Die Klassifikation der verschiedenen Tumorgeewebe war dabei bereits durch H. D. Mennel nach dem zum Entnahmezeitpunkt aktuellsten Gradierungs-Schema der WHO Hirntumorklassifikation vorgenommen worden. Die untersuchten Präparate wiesen allesamt sowohl eine CRLR- als auch eine GFAP-Positivität unterschiedlicher Ausprägung auf. CRLR-positiv zeigten sich vor allem Gefäßendothelzellen und astrozytische Tumorzellen. Zudem zeigten sich vereinzelte im Tumorgewebe gelegene Neurone CRLR-positiv. Neben dem Vorkommen der CRLR-RNS konnte somit der Nachweis der Expression des CRL-Rezeptors in astrozytären Zellen humaner Gliome erbracht werden. Da die Entstehung und zunehmende Malignisierung dieser Tumore mit mitogenen und angiogenen Veränderungen einhergeht, erfolgte zudem die statistische Betrachtung der Anzahl CRLR-positiver Tumorzellen in den unterschiedlichen Tumorgraden.

#### **4.1.3 Quantitativer Vergleich**

Im quantitativen Vergleich zeigte sich die größte Anzahl CRLR-positiver Zellen in Präparaten vom WHO-Grad III, gefolgt vom WHO-Grad II und die niedrigste Anzahl in den Präparaten vom WHO-Grad IV. Eine rein quantitative Korrelation mit dem WHO-Grad ist nicht nachweisbar. Die GFAP-Positivität prozentual zur Gesamtzellzahl zeigte sich am

ausgeprägtesten in den Präparaten vom WHO-Grad II mit absteigender Anzahl bei steigendem Malignitätsgrad. Eine Korrelation der CRLR-Expression mit dem WHO-Grad oder der GFAP-Expressionsstärke konnte nicht gefunden werden [5]. Hierbei wiesen die einzelnen Zählungen zum Teil eine erhebliche Varianz der Anzahl positiver Zellen für den CRLR auf. Die höchste Varianz zeigte sich in den Präparaten vom WHO °II mit 1132,19, gefolgt von den Präparaten vom WHO °I mit 586,37. Eine deutlich niedrigere Varianz zeigten hierbei die Präparate vom WHO °IV mit 74,23. Die Varianz der Gesamtzahl GFAP-positiver Zellen zeigte sich im Vergleich zum CRLR niedriger, hier wurde die höchste Varianz bei den Präparaten vom WHO °II mit 220,22 gefunden, gefolgt vom WHO °III mit 103,43 und schließlich vom WHO °IV mit 90,39 (s. Tab. 4). Zusammengefasst zeigte sich die Zahl positiver Zellen in den untersuchten Präparaten deutlich inhomogen mit der größten Streuung in den Präparaten vom WHO °II.

### **Vergleich in Relation zur Zelldichte**

Zur weiteren Beurteilung wurden die jeweilig ermittelte Anzahl positiver Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl der entsprechenden Zählung gesetzt (s. Abb. 23 und Tab. 4). Hier zeigte sich die gleiche Reihenfolge der Verteilung sowohl in den GFAP-, als auch in den CRLR-Präparaten wie in der rein quantitativen Analyse der positiven Zellen. Der Anteil GFAP-positiver Zellen korreliert dabei negativ mit dem WHO-Grad, wohingegen der Anteil CRLR-positiver Zellen bei den Präparaten vom WHO-Grad III am höchsten ist, gefolgt vom WHO °II und schließlich vom WHO °IV. Hierbei korreliert die Varianz mit dem Mittelwert im jeweiligen WHO-Grad. Je höher der Mittelwert, desto höher zeigt sich die Varianz des Anteils positiver Zellen in den einzelnen Präparaten. Eine starke Expression des CRLR in Bezug zur Zelldichte scheint also mit einer inhomogenen Verteilung desselben innerhalb der jeweiligen WHO-Grade einherzugehen. Unabhängig vom WHO-Grad bestätigt sich diese Beobachtung nicht; die Varianz der CRLR-Expressionsstärke zeigt sich im WHO-Grad II am höchsten, die Expressionsstärke in Relation zur Zelldichte im WHO-Grad III. Aufgrund der ausgeprägten Streuung sollte eine direkte Interpretation der Häufigkeitsverteilungen hier nur sehr eingeschränkt erfolgen. Ein Rückschluss auf den zugrundeliegenden WHO-Grad anhand der Expressionsstärke des CRLR scheint nicht möglich zu sein. Denkbar sind diesbezüglich jedoch weitere Studien wie ein gepaarter Stichproben-

vergleich mit proliferationsassoziierten Molekülen wie dem Ki-67-Antigen, welches ebenfalls einer hohen Streuung unterliegt.

#### **4.1.4 Analyse des IRS**

Aufgrund der durch die Präparatverarbeitung hervorgerufenen unterschiedlichen Färbeintensitäten der einzelnen Präparate wurde zudem der IRS erfasst und ausgewertet. Ziel dieses Vorgangs ist die Verbesserung der Vergleichbarkeit der Immunoreaktivität, durch die Ermittlung einer reproduzierbaren Größe. Die Auswertung spiegelte dabei nur zum Teil die zuvor ohne Beachtung der Färbeintensität gewonnenen Ergebnisse wieder. Abweichend zur vorherigen Analyse ohne Einbeziehung der Färbeintensität zeigte sich hier keine negative Korrelation des GFAP mit dem WHO-Grad. Jedoch konnte hier eine signifikante negative Korrelation des CRLR gegenüber dem GFAP in den Präparaten vom WHO-Grad II ermittelt werden. Dies weist darauf hin, dass in diesen Präparaten eine Abnahme des GFAP mit einer Zunahme des CRLR einhergeht. Da das GFAP ein Maß für die astrozytäre Differenzierung darstellt, bedeutet dies innerhalb der Präparate vom WHO °II: Je niedriger die astrozytäre Differenzierung eines Tumors, desto stärker ist die Expression des CRLR. Ein entsprechendes Ergebnis zeigte sich in den höhergradigen Präparaten jedoch nicht. Innerhalb der Präparate vom WHO °II könnte dies ein Hinweis auf eine gesteigerte Proliferationstendenz bei zunehmender Entdifferenzierung sein. Ein Rückschluss auf den WHO-Grad anhand des CRLR-IRS ist auch hier nicht möglich. Bezüglich der Inhomogenität ist ein Zusammenhang mit der variablen Proliferationsaktivität innerhalb unterschiedlicher Tumoranteile möglich, was in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Insgesamt würde dies jedoch in der Tumorphysik kein unbekanntes Phänomen darstellen: In der Routinediagnostik gibt es Antikörper, welche den spezifischen Nachweis proliferationsassoziierten Moleküle erlauben. Hierzu zählt MIB-1, der sich gegen das zellzyklusassoziierte nukleäre Ki-67-Antigen richtet. Durch die Möglichkeit, in Paraffin eingebettetes Material zu untersuchen, konnten bereits umfangreiche Daten über alle wesentlichen zentralnervösen Tumorentitäten erhoben werden. Es zeigte sich, dass im statistischen Mittel eine gute Korrelation zwischen der Fraktion proliferationsaktiver Tumorzellen und der mit klassischen histopathologischen Kriterien ermittelten biologischen Wertigkeit besteht [2]. In praktisch allen Studien zeigten sich allerdings individuelle Schwankungen und Überlappungen zwischen verschiedenen Tumorgraden, wodurch die prognostische Relevanz von

Proliferationsuntersuchungen im Tumorgewebe für individuelle Patienten erheblich eingeschränkt ist. Diese Schwankungen mögen sich zum einen aus dem Problem der Probenentnahme aus einer repräsentativen Region des Tumors ergeben, zum anderen dürften sie auch darauf beruhen, dass neben der Tumorproliferation auch andere Faktoren erheblichen Einfluss auf das Tumorstadium haben. Hierbei sind Nekrosen, Apoptose, die Länge des Zellzyklus und nicht zuletzt die Tumorstigmatisierung zu nennen, welche allesamt einen erheblichen Einfluss auf das Stadienwachstum von Tumorgewebe haben. Aus diesen Gründen sowie der großen Variabilität zwischen verschiedenen Laboratorien hat der Ki-67-Index als separates Kriterium bisher keinen Eingang in die WHO-Klassifikation gefunden. Da auch die Expressionsstärke des CRLR eine hohe Varianz und Überlappung zwischen den einzelnen WHO-Graden aufweist, wäre ein Vergleich zwischen dem Ki-67-Antigen und dem CRLR interessant.

#### **4.1.5 Vergleichbarkeit der Stichproben in GFAP und CRLR-Präparaten**

Um die Vergleichbarkeit der Stichproben der GFAP- und CRLR-Präparate zu untersuchen, wurde die Gesamtzelldichte, unabhängig von einer entsprechenden Positivität oder Negativität in den einzelnen Präparaten verglichen. Da pro Präparat jeweils zehn Stellen ausgezählt wurden, und für den Vergleich GFAP mit CRLR jeweils aufeinanderfolgende Schnitte verwendet wurden, sollte eine gute Vergleichbarkeit der gepaarten Stichproben zu erwarten sein. Der Vergleich der Einzelzählungen zeigte dabei entsprechend eine gute Korrelation der Zelldichte in den GFAP-Präparaten mit den CRLR-Präparaten. Insgesamt zeigte sich die Gesamtzelldichte in den CRLR-Präparaten jedoch geringer als in den GFAP-Präparaten. Hierbei zeigt sich eine gute Vergleichbarkeit durch die gepaarten Stichproben. Zur genaueren Untersuchung wurde dann die Korrelation der Zelldichte für jedes einzelne Präparat, also für den Mittelwert der Einzelzählungen berechnet, wobei sich im Gegensatz zur Betrachtung aller Zählungen zusammen deutlichere Unterschiede zeigten. Dies ist Ausdruck der Inhomogenität innerhalb der einzelnen Tumore. Eine Hohe Schwankung zeigte sich hier vor allem in den Präparaten vom WHO °III. Um Ausreißer zu eliminieren wurde zur Beurteilung der Median berechnet. Eine Korrelation der Zelldichte wurde daher für jedes einzelne Präparat (aus allen Einzelzählungen) bestimmt. Diese wurden dann mit den anderen Präparaten innerhalb desselben WHO-Grades verglichen. Der Median aller Korrelationskoeffizienten des WHO °III war hierbei lediglich 0,33, bei entsprechend hoher

Standardabweichung von 0,18. Aus den Präparaten vom WHO °IV resultierte dagegen im Median ein Korrelationskoeffizient von 0,94, in denen vom WHO °II immerhin von 0,88. Insgesamt zeigt sich im WHO °III also eine vergleichsweise starke Abweichung der Gesamtzelldichte im Vergleich der GFAP- mit den CRLR-Präparaten, welche im Gegensatz zu allen anderen Präparaten zudem nicht gemeinsam variieren. Sowohl die quantitative Positivität, die prozentuale Positivität als auch der IRS zeigen bei den CRLR-Präparaten vom WHO °III die höchste Varianz. Als Ursache dafür ist zum einen die Inhomogenität der Tumore und Tumoranteile dieses WHO-Grades möglich, was jedoch nicht eine stark ausgeprägte Varianz der Zelldichte innerhalb der einzelnen Präparate erwarten lässt. Eine weitere Ursache kann die Zerstörung eines Teils der Zellen bei der Aufbereitung sein; ein Zellverlust bei der 20 minütigen Erhitzung in der Mikrowelle mit anschließender Wäsche ist dabei denkbar. Hierfür würde auch die Tatsache sprechen, dass die Präparate der jeweiligen WHO-Grade gemeinsam bearbeitet wurden, und die Abweichungen lediglich innerhalb der Präparate vom WHO °III zu beobachten sind.

Insgesamt sollte daher ein Vergleich der Expressionsstärken des CRLR und des GFAP vom WHO °III nur unter Vorbehalt erfolgen, stattdessen sollte hierzu eine erneute Aufarbeitung und Analyse dieser Präparatgruppe erfolgen. Da sich die gemittelte Gesamtzellzahl der einzelnen Präparate jedoch nicht wesentlich voneinander unterscheidet, ist es durchaus möglich dass die fehlende Korrelation ein Ausdruck der in diesen Tumoren vorhandenen Inhomogenität ist. Die Vergleichbarkeit aller anderen Präparate ist gefolgert aus der guten Korrelation in den Zählungen gegeben. Dies ist vor allem für die Präparate vom WHO °II interessant, in denen sich nach Berechnung des IRS eine negative Korrelation der Expressionsstärke von GFAP und CRLR zeigte.



## 4.2 Der CRL-Rezeptor

In dieser Arbeit konnte das Vorkommen des CRLR in verschiedenen Zelltypen innerhalb von Gliomen nachgewiesen werden. Dabei unterliegt die Expressionsstärke einer Dynamik, eine Korrelation mit dem entsprechenden WHO-Grad findet sich nicht [5]. Hierbei wurde nicht untersucht ob es sich bei den Bindungsstellen um Adrenomedullin-, Intermedin- oder CGRP-Rezeptoren handelt.

Der CRLR dient nach heutigem Stand der Forschung als Rezeptor für drei verschiedene Neuropeptide, nämlich Adrenomedullin, CGRP und Intermedin (=Adrenomedullin 2), wobei seine Spezifität durch die Kopplung des Rezeptors an ein RAMP bestimmt wird [73]. Durch Kopplung des Rezeptors an ein RAMP1 entsteht so ein CGRP-Rezeptor, welcher bei einer zehnfach schwächeren Affinität auch als AM oder Intermedin Rezeptor fungieren kann. Durch Kopplung an ein RAMP2 entsteht vornehmlich ein AM-Rezeptor, mit deutlich schwächerer Affinität zu Intermedin und 50-fach schwächerer zu CGRP. Die Kopplung des CRLR an ein RAMP3 wird als Intermedin-Rezeptor bezeichnet, wobei dieser eine ähnliche Affinität zu AM hat und eine schwächere zu CGRP [49].

Das Vorkommen von Adrenomedullin konnte bislang in zahlreichen Geweben und Zellen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden, CGRP wird unter anderem in perivaskulären Nerven produziert [70].

### 4.2.1 CRLR und Adrenomedullin

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression des CRLR in Endothelzellen, gefäßnahen und abseits von Gefäßen gelegenen astrozytären Tumorzellen sowie in kortikalen Neuronen weist auf unterschiedliche biologische Effekte des hier nachgewiesenen Rezeptors hin. Solche unterschiedlichen Effekte konnten bereits bei Untersuchungen der Auswirkung von Adrenomedullin auf die Tumorgenese nachgewiesen werden. Durch Einwirkung eines Adrenomedullin Antikörpers konnten deutliche sowohl anti-mitogene als auch anti-angiogene Stimulationen auf das Tumorwachstum erreicht werden [85].

Diese Beobachtung deckt sich mit dem in dieser Studie erbrachten Nachweis von gefäßnahen sowie gefäßfernen CRLR-positiven Zellen innerhalb der Tumoren. So wäre eine überwiegend mitogene Wirkung in erster Linie von gefäßfernen Zellen zu erwarten, wohingegen eine angiogene Wirkung wie Migration und neue Gefäßsprossungen eher von gefäß-

nahen Zellen zu erwarten ist. Da die Produktion des Adrenomedullin durch Endothelzellen gezeigt werden konnte [34], ist eine parakrine Wirkweise des Adrenomedullin auf die gefäßnahen Rezeptoren denkbar.

Das Vorkommen des Rezeptors in den untersuchten Präparaten unterliegt einer Dynamik, wobei eine deutliche Zunahme der Rezeptordichte zwischen Präparaten vom WHO-Grad II zum WHO-Grad III zu beobachten ist. Bezüglich der Tumore vom WHO-Grad II zum WHO-Grad III ist beim Übergang in die malignere Form der Astrozytome auch das bereits erwähnte Phänomen des „Switch to the angiogenic state“ zu beobachten [46]. Anhand der bisher veröffentlichten Daten lässt sich die Teilhabe des Rezeptors an diesem Vorgang vermuten. Bestärkt wird diese These zudem bei der Betrachtung des Adrenomedullins, eines der Liganden an diesem Rezeptor. Der Nachweis von Adrenomedullin in Glioblastomzellen konnte dabei bereits erbracht werden [107]. Die Hemmung des Adrenomedullins in Glioblastom-Xenografts durch Antikörper bewirkte dabei signifikant eine Wachstumssupprimierung des Gewebes sowie auch der Neovaskularisation [6][85].

Die Wirkung des Adrenomedullin auf die Neovaskularisation konnte am Tiermodell an männlichen Lewis-Ratten gezeigt werden. Die besondere Wirkung des Adrenomedullins auf die Angiogenese zeigte sich dabei in Untersuchungen im Knochenmark, in dem das Peptid sowohl die Differenzierung von mononukleären Zellen zu Endothelzellen als auch die Formation dieser Zellen zu Gefäßen bewirkt [57]. Zudem konnte in verschiedenen Geweben gezeigt werden, dass durch Adrenomedullin die Apoptose von Endothelzellen und Tumorzellen verhindert bzw. deren Apoptoseresistenz verstärkt wird [59][72][83]. In Zelllinien von menschlichem Endometrium, Brust- und Pankreastumoren zeigte sich eine erhöhte Gefäßdichte bzw. ein gesteigertes Gefäßwachstum in den ADM überexprimierenden Transfektanten [56][72][83]. Zudem korreliert in Leiomyomen die Expression von ADM mit der Gefäßdichte und dem endothelialen Zell-Proliferationsindex [42]. Viele dieser Beobachtungen wurden nicht an astrozytären Tumoren gemacht, entsprechende Effekte sind hier jedoch naheliegend oder zumindest möglich.

Der Grund der in dieser Arbeit beobachteten deutlich niedrigeren Rezeptordichte bei astrozytären Tumoren vom WHO Grad IV, den Glioblastomen, ist letztlich unklar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die bei der Malignisierung zunehmende Entdifferenzierung der Zellen. Dementsprechend zeigte sich innerhalb der Präparate vom WHO °II eine signifikante negative Korrelation der CRLR- und GFAP-Expressionsstärke nach Anwendung des

IRS. Im Vergleich der Präparate vom WHO °II mit denen vom WHO °IV zeigt sich hier eine Abnahme der Expressionsstärke von GFAP und CRLR. Diesbezüglich müssen jedoch auch weitere mögliche Faktoren, wie eine Vorbehandlung mit Dexamethason, in Betracht gezogen werden. Hierzu wird auf das entsprechende Unterkapitel 4.2.3 verwiesen. Im Gegensatz zur Rezeptordichte des CL-Rezeptors korreliert die Adrenomedullin m-RNS Konzentration eindeutig mit dem Tumorgrad. So konnte mittels quantitativer Echtzeit reverser transcriptase-polymerase Kettenreaktionsanalysen gezeigt werden, dass die Adrenomedullin-mRNS-Expression in allen untersuchten Glioblastomen hoch, in anaplastischen Astrozytomen niedrig und in niedergradigen Astrozytomen kaum nachweisbar ist [6].

Um bei der Untersuchung der Rezeptordichte die Möglichkeit einer Fehlinterpretation auszuschließen, welche durch die teilweise ausgeprägten nekrotischen Gewebsanteile in Glioblastomen verursacht werden könnte, erfolgte in dieser Studie ein direkter lokaler Vergleich mittels Nachweis des GFAP, welches ein eindeutiger Marker für das Vorhandensein von vitalem, astrozytärem Gewebe ist.

Ein weiterer Pathomechanismus, welcher in einigen Geweben und während bestimmter physiologischer sowie auch pathophysiologischer Zustände nachgewiesen werden konnte, ist die vermehrte Adrenomedullinausschüttung bei hypoxischen Zuständen des untersuchten Gewebes [53]. Die Expression von Adrenomedullin mRNS wird in einer Vielzahl von menschlichen Zellen in hohem Maße durch Hypoxie induziert [33]. Diese Beobachtung wurde durch den Nachweis der Induktion von Adrenomedullin mRNS in humanen Glioblastomzelllinien bestätigt [62]. Eine durch Hypoxie induzierte Adrenomedullin-Gen Expression konnte auch in kultivierten endothelialen Zellen umbilikaler Venen gezeigt werden [84]. Fokale ischämische Areale des Rattengehirns zeigen zudem eine erhöhte Adrenomedullin mRNS-Expression [113], und sogar Patienten mit COPD weisen einen erhöhten Adrenomedullin Plasmaspiegel auf [15].

Ischämische und hypoxische Areale finden sich auch innerhalb von Tumoren, was sich unter anderem in den oben erwähnten und für diese Tumore signifikanten Nekrosen bei Glioblastomen zeigt. Bei zunehmendem Tumorwachstum entsteht dabei auch ein zunehmender Blut- und Sauerstoffbedarf, welcher in einigen Tumorarealen nicht mehr gewährleistet werden kann, sodass es hier zu einem Absterben von Gewebe kommt. Hämodynamisch entspricht das dem sogenannten Steal-Effekt innerhalb eines Tumors. Das Adrenomedullin kann, wie in einigen Geweben gezeigt und oben beschrieben, durch Vermittlung

von Gefäßdifferenzierungen und Sprossungen dem Zustand der Minderversorgung entgegenwirken. In Versuchen am ischämischen Rattencortex konnte gezeigt werden, dass zum einen der Adrenomedullinspiegel nach dem ischämischen Ereignis deutlich erhöht ist, und zwar um das etwa zwanzigfache nach ca. 6 Stunden, zum anderen dass die Anwesenheit von Adrenomedullin dem durch die Ischämie hervorgerufenen Gewebeschaden entgegenwirkt [112]. Die bei Glioblastomen nachgewiesene, im Vergleich zu Astrozytomen vom WHO-Grad III verminderte Rezeptordichte des CRL-Rezeptors ist eine mögliche Erklärung für die besonders bei Glioblastomen auftretenden Nekrosen; trotz vermehrter Anwesenheit des Liganden Adrenomedullin, dessen Produktion innerhalb glialer Zellen mit dem WHO-Grad korreliert [6] ist die vermittelte Antwort (Anpassung an die Minderversorgung des Gewebes durch Neovaskularisation) bei Abnahme der Rezeptordichte vermindert, es resultiert auf längere Sicht schließlich die Entstehung von Nekrosen. Der direkte Nachweis eines solchen möglichen Vorganges ist jedoch sehr schwer zu führen, da die aus den Operationen gewonnenen Präparate jeweils nur eine Momentaufnahme während der Tumorgenese darstellen. In bereits nekrotischem Gewebe lässt sich der Nachweis des CRLR nicht erbringen, ebenso ist die Beobachtung eines Tumoranteils mit niedriger Rezeptordichte in vivo über einen längeren Zeitraum praktisch unmöglich.

Ein möglicher Ansatz für weiterführende Studien wäre hierbei die Untersuchung einer möglichen Korrelation der Gefäßdichte von Tumoren mit der Dichte des CRL-Rezeptors, der lokalen Adrenomedullinkonzentration, der Anzahl und volumenmäßigen Ausprägung von Nekrosen und bezüglich dieser Merkmale der Vergleich zentralen und peripheren Tumorgewebes innerhalb eines Tumors. Eine mögliche Konstellation zur Unterstützung der These wäre dann eine hohe Rezeptordichte innerhalb peripherer Anteile bzw. vitalem und schnell wachsendem Tumorgewebe und im Vergleich dazu eine niedrige Rezeptordichte in zentralen Tumoranteilen in Nachbarschaft von Nekrosen kombiniert mit einer aus der Hypoxie resultierenden vermehrten Ausschüttung von Adrenomedullin, welche gefolgert aus den Versuchen am ischämischen Rattenhirn auch kurzfristig erfolgt. Die Regulation der Adrenomedullin-Expression innerhalb von Glioblastomen unter hypoxischen Bedingungen wurde in humanen Glioblastomzelllinien untersucht und zeigte einen signifikanten Anstieg der AM Expression unter Hypoxie, welcher nach Normalisierung des Sauerstoffdruckes wieder reversibel war [74]. In der selben Arbeit konnte zudem in Glioblastomen in vivo eine vermehrte Expression von VEGF und AM in direkter Nachbarschaft von Nekrosen

beobachtet werden, was die obige Hypothese unterstützt. Die nekrotischen Areale wurden dabei teilweise regelrecht von AM-exprimierenden Zellen umringt.

Weiter ist die Untersuchung der Spezifität und Affinität der Rezeptoren in den untersuchten Arealen essentiell. In dieser Studie wurden keinerlei Untersuchungen bezüglich der an den CRLR gekoppelten RAMPs gemacht, somit ist die Spezifität bzw. Affinität zu den möglichen Liganden unklar.

Adrenomedullin-Bindungsstellen wurden bereits in den meisten menschlichen Geweben nachgewiesen [52]. Auch wurde das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen innerhalb zahlreicher Regionen des menschlichen Gehirns nachgewiesen [103]. In Gliomzelllinien von Ratten zeigte sich, dass diese eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Adrenomedullin aufweisen ( $K_d = 24 \text{ nmol/L}$ ). Sie hatten eine Rezeptordichte von ca. 36000 pro Zelle; exogen zugeführtes Adrenomedullin führte in Versuchen zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem AMP sowie der c-fos mRNA Expression [76].

Die nachgewiesene Expression von Adrenomedullin sowie die Ausbildung von Rezeptoren in Gliomzellen sprechen insgesamt für die Funktion dieses Peptids als parakriner und autokriner Wachstumsfaktor. Ebenso spricht die signifikante Wachstumssupprimierung mittels Neutralisierung des Adrenomedullin durch Antikörper in Proliferationsassays, welche durch exogene Zugabe von Adrenomedullin wieder aufgehoben werden konnte, für diese These. Wahrscheinlich ist das Vorhandensein eines autokrinen Regelkreises, welcher das Tumorstadium vorantreibt. Solche Vorgänge konnten für andere Proteine bereits beschrieben werden [21][92]. Dabei konnte speziell auch der angiogenetische Effekt des Adrenomedullins gezeigt werden [85]. Hieran sind jedoch ebenso zahlreiche andere Proteine beteiligt.

Bestehende zelluläre Regelkreise, welche das Gliomwachstum signifikant beeinflussen, werden zum Beispiel beim VEGF/VEGF-Rezeptorkomplex [14][100], bei Angiopoetinen, tie-Rezeptor Tyrosinkinasen und weiteren Proteinen vermutet [105]. Möglich und wahrscheinlich ist, dass sich unterschiedliche Tumortypen auch unterschiedlicher Regelkreise bedienen. Ebenso ist der Wechsel von einem Regelkreis zu einem anderen innerhalb eines Tumors zur Deckung des Blut- und Sauerstoffbedarfs denkbar. Dieses stellt eine weitere mögliche Erklärung der Tatsache dar, dass Glioblastome eine deutlich geringere CRL-Rezeptordichte aufweisen als Gliome vom WHO Grad III. Da es sich bei den Glioblastomen um Tumore mit einer ausgeprägten Heterogenität handelt, ist hier auch eine unter-

schiedliche Häufigkeitsverteilung von Regelkreisen innerhalb unterschiedlicher Tumorregionen möglich. Zudem besteht Anlass zur Annahme, dass die verschiedenen Regelkreise sich gegenseitig beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass Adrenomedullin in Zellen des mikrovaskulären Endothels sowohl eine Aufregulation des CRL-Rezeptors als auch des VEGF-Rezeptors bewirkt [101]. Die Bedeutung des CRLR sowie des vollständigen Rezeptorkomplexes nimmt dadurch weiter zu.

Die Diagnosestellung und Gradierung eines Glioms erfolgt neuropathologischerseits nach dem Anteil mit der höchsten Malignität innerhalb des aus dem Operationssaal eingesendeten Probematerials. In der Regel zeigen diese Bereiche in der radiologischen Diagnostik auch die stärkste Kontrastmittelaufnahme, weshalb Bereiche mit starker Kontrastmittelaufnahme bei der stereotaktischen Biopsie auch als Zielgebiet verwendet werden. Auch bei der offenen Biopsie wird heute möglichst ein Tumoranteil mit starker Kontrastmittelaufnahme entnommen, welcher in der Regel unter Zuhilfenahme der Neuronavigation aufgefunden wird. Das Tumormaterial, welches den routinemäßigen Resektionen entstammt, wird intraoperativ meist aus soliden und im Gegensatz zum normalen Hirngewebe deutlich verändert wirkenden Tumoranteilen gewonnen, wohingegen in Randgebieten des makroskopisch sichtbaren Tumors aufgrund der hier deutlich schonenderen Präparationstechnik das meiste Gewebe abgesaugt und verworfen wird. Insgesamt besteht also hinsichtlich des hier untersuchten Gewebes eine Vorselektion. Es besteht die Möglichkeit, dass sich in anderen Arealen innerhalb der untersuchten Tumore abweichende Ergebnisse gezeigt hätten.

#### **4.2.2 CRL-Rezeptor und CGRP**

Hinweise für eine entscheidende Rolle des CGRP als weiterer Ligand des CRL-Rezeptors bei der Tumorgenese gibt es derzeit nicht; vielmehr scheint dieses Peptid eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie der Migräne oder auch des Vasospasmus inne zu haben [7]. CGRP ist im trigeminovaskulären System lokalisiert, wo es potente vasoaktive und nozizeptive Effekte aufweist. Versuche an Primaten und Nagern konnten zeigen, dass die über den Nervus trigeminus vermittelte neurogene Vasodilatation durch CGRP-Antagonisten inhibiert werden kann [24].

Ebenfalls an Primaten konnte bereits 1996 gezeigt werden, dass die Applikation von CGRP in den Liquorraum in der Lage ist, den auf eine Subarachnoidalblutung folgenden

Vasospasmus zu unterdrücken [55]. Ein ähnlicher Effekt konnte bei intrathekalen Applikationen in Experimenten mit Ratten nachgewiesen werden [54].

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass im Rahmen des Vasospasmus eine herabgesetzte Empfindlichkeit der Blutgefäße gegenüber CGRP besteht [106]. Hierbei liegen eher myogene Gefäßreaktionen zugrunde. Innerhalb eines Tumors weist die Mehrzahl der Gefäße eine gestörte Struktur auf, ein daraus resultierender Effekt ist die in diesen Tumoren aufgehobene cerebrale Autoregulation des Blutdrucks. Wirkungen des CGRP wurden bisher jedoch nur auf Gefäße mit einer zellulär unveränderten Integrität nachgewiesen. Hinweise einer Beteiligung des Liganden bei der Tumorgenese fehlen bislang und scheinen eher unwahrscheinlich.

#### **4.2.3 CRL-Rezeptor und Intermedin**

Die höchste Affinität des CRLR für Intermedin wird durch Koexpression an RAMP3 erreicht, wobei die Affinität dieses Rezeptors für Adrenomedullin etwa gleich hoch ist. Vorkommen und biologische Aktivitäten des Intermedins sind dabei wesentlich weniger erforscht als die des ADM [49]. Insgesamt ähneln die bisher bekannten Funktionen des Intermedins denen des Adrenomedullins, wobei diese wesentlich schwächer ausgeprägt zu sein scheinen. Als Beispiel hierfür weisen Knockout-Mäuse ohne RAMP3 keine nachweisbaren Gefäßveränderungen auf und zeigen keine verkürzte Lebenserwartung, wohingegen solche ohne AM, CRLR oder RAMP2 aufgrund erheblicher Gefäßdeformitäten in utero versterben [49].

Als Ligand des CRLR sei das Intermedin hier trotzdem erwähnt, mögliche Funktionen bei der Tumorgenese müssen jedoch abgewartet werden.

#### **4.2.4 CRL-Rezeptor und Glucocorticoide**

Ein weiterer zu betrachtender Punkt ist die bislang nicht hinreichend erklärte Wirkung von Glucocorticoiden bei Patienten mit glialen Tumoren. Hierbei konnte unter anderem eine proliferationshemmende Komponente dieses Wirkstoffes bei diesen Tumoren beobachtet werden [3][97]. Aufgrund der erwiesenen klinischen Wirkung zählen Glucocorticoide bei der Behandlung zu den Standardtherapeutika, wobei die Hauptwirkung der hierdurch vermittelten Verminderung des perilesionellen Ödems zugeschrieben wird. Dies ist ein Effekt, welcher sich aus der klinischen Erfahrung bei andersartigen Ödemen nicht nachweisen

lässt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der Haupteffekt der Ödemreduktion durch Kortikosteroide auf einem antagonistischen Effekt zu VEGF beruht [50] und eine hohe Korrelation der Wirkung zur Gefäßdichte besteht [37]. In jüngster Zeit konnten nun zudem Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Wirkung der Glucocortikoide und Adrenomedullin erbracht werden. Untersucht wurden Zellkulturen menschlicher Glioblastomzellen. Hier konnte dosisabhängig eine Steigerung der Adrenomedullin mRNA-Konzentration sowie auch der Konzentration des immunoreaktiven Adrenomedullins nachgewiesen werden. Unter bestimmten Bedingungen zeigte sich jedoch im Gegensatz dazu eine Suppression der Adrenomedullinexpression. So fand sich unter gleichzeitiger Anwesenheit der Cytokine Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  ebenfalls eine erhöhte Adrenomedullinexpression, welche durch Gabe von Dexamethason supprimiert werden konnte [109].

Bereits Erwähnung fand die Tatsache, dass in Glioblastomzellen die Anwesenheit von Adrenomedullin eine Upregulation des CRLRs, aber auch von VEGF-Rezeptoren bewirkt. Auch wurde die antagonistische Wirkung von Glucokortikoiden auf das VEGF beschrieben. In Zusammenschau dieser Tatsachen stellt sich die Frage, ob ein Teil dieser antagonistischen Wirkung durch Adrenomedullin vermittelt wird bzw. ob der direkte antagonistische Effekt der Glucokortikoide auf das VEGF in Glioblastomzellen über eine Supprimierung des Adrenomedullin und darüber durch eine Downregulation der VEGF-Rezeptoren verstärkt wird. Einen Aufschluß über diese Hypothese könnten entsprechend weitere Studien liefern.

In diesem Zusammenhang müssen auch die Ergebnisse dieser Arbeit betrachtet werden. Die schwächste Expressionsstärke zeigten die Präparate vom WHO °IV, dem Glioblastom. Diese Tumore haben in der Regel ein sehr typisches Erscheinungsbild im MRT, die Operation erfolgt fast immer nach einigen Tagen in einem geplanten Setup und nach vorheriger, mehrtägiger Dexamethasontherapie. Bei niedergradigeren Tumoren findet die Anwendung einer solchen Vormedikation entsprechend seltener Anwendung, wurde jedoch in dieser Studie nicht dokumentiert. Sollte sich eine solche medikamentöse Therapie bei den entsprechenden Tumoren tatsächlich auf die Adrenomedullin-Produktion, und somit wiederum auf die CRLR-Synthese auswirken, so könnte dies sowohl für die Abnahme der Rezeptordichte im WHO °IV, als auch für die ausgeprägte Streuung im WHO °III eine Erklärung bieten.



#### **4.2.5 CRL-Rezeptor und Neurone**

Kortikale Neurone, vermutlich im Tumor selber eingeschlossen und insbesondere deren Perikaria, zeigten sich vereinzelt aber konstant kräftig CRLR positiv (s. Abb. 16). Die meisten von ihnen zeigten einen veränderten Aufbau, vermutlich als Resultat auf den Einfluss des umgebenden Tumorgewebes. CRLR positive Neurone konnten vor allem in tieferen kortikalen Schichten beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen konnten bisher in gesundem Hirngewebe nicht gemacht werden. Es scheint sich daher um eine Auswirkung des Tumors selbst auf die Neurone zu handeln, welche sich neben der CRLR-Positivität auch im leicht veränderten Aufbau widerspiegelt. Die Funktion des Rezeptors in diesen Zellen bleibt dabei bisher völlig unklar. Neurone zeigen beim Erwachsenen weder mitotische Aktivität, noch sind sie in der Nähe von Blutgefäßen zu finden. In diesem Zusammenhang sind eventuell die Beobachtungen bezüglich des reichlichen Vorhandenseins von CGRP-Rezeptoren auf sensorischen Nerven wichtig [19]. Diese beweisen zumindest die Fähigkeit von Neuronen allgemein, den Rezeptor zu exprimieren. Die Positivität in den untersuchten Präparaten mag lediglich ein Nebeneffekt vermittelt durch das lokale Milieu sein. So ist eine durch einen erhöhten Adrenomedullinspiegel bzw. hypoxische Zustände vermittelte Erhöhung der Rezeptorexpression auch bei diesen Zellen denkbar.

Insgesamt zeigt sich ein vielseitiges Spektrum an Regelkreisen und Interaktionsmustern, welche durch Neuropeptide vermittelt werden. Diese Vorgänge und Abläufe sind bisher nur in Ansätzen erforscht. Die Liganden des CRLR scheinen hier einen breitgefächerten und wichtigen Anteil zu haben. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis des CRL-Rezeptors in humanen Gliomen und dessen Expressionsstärke in den unterschiedlichen Malignitätsgraden trägt einen Teil zur Aufklärung dieser Vorgänge bei, wobei sich eine Vielzahl weiterer Fragestellungen eröffnet.

#### **4.3 Ausblick**

Eine derzeit viel diskutierte Möglichkeit ist die direkte Therapie über antiangiogenetische Faktoren, wobei zunächst insbesondere VEGF als möglicher Ansatzpunkt betrachtet wurde. Allerdings sind bisherige Studien an Menschen nicht über Pilotprojekte hinausgekommen. So gab es erste Versuche, eine Radioimmuntherapie mit Anti-Tenascin-Antikörpern zu initiieren, welche jedoch bislang auf Phase I Studien begrenzt blieben [96]. Wie im

Tiermodell gezeigt werden konnte, beruht die Ödementstehung ebenfalls in weiten Teilen auf VEGF [50], so dass spezifische Antikörper nicht ausschließlich unter kurativen sondern auch unter palliativen Gesichtspunkten interessant erscheinen. Hier zeigen erste Studien in Kombination mit Strahlentherapie gute Erfolge [4] [64]. Inwiefern sich diese jedoch in der Praxis durchsetzen und welchen therapeutischen Nutzen die Patienten im Endeffekt davontragen, bleibt zukünftigen Studien überlassen. Wie bereits ausführlich erwähnt, wird die Expression des VEGF durch Einwirkung von Adrenomedullin beeinflusst, was auch durch die Korrelation dieser Peptide in Gliomen unterschiedlicher Malignität unterstrichen wird. Im Gegensatz zur VEGF induzierten Angiogenese, welche nicht mit einer Gefäßreifung assoziiert ist, wird durch Adrenomedullin die volle Gefäßreifung mit samt glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt [74]. Eine mögliche antiangiogene Therapie durch Blockierung des CRL-Rezeptors bzw. durch Antagonisierung des Adrenomedullins bei Glioblastomen muss daher trotz der deutlichen Abnahme der Rezeptordichte in den untersuchten Präparaten nicht zwingend weniger erfolgversprechend sein. Vielmehr stellt sich hier die Frage nach der Wirksamkeit kombinierter anti-angiogener Therapieverfahren, welche bisher nicht untersucht wurden. Der Adrenomedullin-vermittelte Signalweg scheint dabei einen Ansatz für eine anti-angiogene Therapie bei Gliomen darzustellen.

## **5 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurden humane Gliome vom WHO-Grad II-IV auf das Vorkommen des Calcitonin receptor-like Rezeptors untersucht. Hierzu erfolgte zunächst der Nachweis der CRLR-RNS in den humanen Gliomzelllinien G 109 und G 139, welche sich eindeutig positiv zeigten. Sodann wurden paraffinasservierte Schnitte aus humanen Gliomen mittels immunhistochemischer Färbung auf das Vorkommen des CRLRs untersucht. Hierzu diente ein Antikörper gegen den CRLR, die Visualisierung erfolgte mittels PAP-Methode. Die Auswertung erfolgte mittels Zählung im genormten Okularzählfeld. Hierbei wurden für jedes Präparat die CRLR- bzw. GFAP-positiven Zellen, sowie die Gesamtzellzahl und Färbeintensität im jeweiligen Präparat erfasst. In jedem Präparat erfolgte dabei die Zählung an 10 verschiedenen Stellen. Hierbei wurden 10 Tumore vom WHO °II, 10 Tumore vom WHO °III und 24 Tumore vom WHO °IV untersucht. Als Positivkontrollen diente das Gefäßendothel, als Negativkontrolle die äußere Gefäßwand. Insgesamt zeigten sich hierbei alle

unersuchten Tumore CRLR- und GFAP-positiv. Eine Korrelation der CRLR-Expression mit dem WHO-Grad konnte hierbei weder nach Betrachtung der einfachen Positivität, noch nach Anwendung des IRS und somit Berücksichtigung der Färbeintensität des jeweiligen Präparates gefunden werden. Die stärkste Expression zeigten die Präparate vom WHO °III, jedoch ebenso die größte Varianz. Die niedrigste Expressionsstärke zeigten die Glioblastome (WHO °IV). Nach Anwendung des IRS zeigte sich in den Präparaten vom WHO °II eine signifikante negative Korrelation der GFAP- und CRLR-Expression ( $p < 0,05$ ), was eine Zunahme der CRLR-Expression bei einer Abnahme der GFAP-Expression bedeutet, und was als Zunahme der CRLR-Dichte bei fortschreitender Entdifferenzierung interpretiert werden kann. Zusätzlich zur hohen Varianz der CRLR-Expressionsstärke in den Präparaten vom WHO °III zeigte sich hier auch eine deutliche Abweichung der Gesamtzelldichte in den verglichenen GFAP- und CRLR-Präparaten. Eine Erklärung hierfür bietet eine mögliche Inhomogenität dieser Tumore. Ein Fehler bei der Aufbereitung der Präparate als Ursache durch Auswaschung kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber sehr unwahrscheinlich, da die Aufarbeitung einheitlich und größtenteils auch zeitgleich erfolgte. Ein direkter Vergleich der GFAP- mit der CRLR-Expressionsstärke in diesen Präparaten sollte trotzdem nur eingeschränkt erfolgen, wobei trotz möglichem Zellverlust bei der Aufbereitung die Gesamtzahl der CRLR-positiven Zellen in diesen Präparaten deutlich über denen der übrigen Präparate liegt. Der Vergleich der CRLR-Expressionsstärke in Abhängigkeit vom WHO-Grad scheint daher zulässig. Insgesamt zeigten sich in allen Präparaten gefäßnahe und gefäßferne, sowie auch vereinzelte Neurone CRLR-positiv.

Der eindeutige Nachweis des CRLR in humanen Gliomen vom WHO-Grad II-IV konnte somit erbracht werden. Seine Expressionsstärke scheint, abgesehen von den Präparaten vom WHO °II, kein Maß für die biologische Wertigkeit dieser Tumore zu sein. Aufgrund der inzwischen nachgewiesenen Effekte der Liganden dieses Rezeptors, insbesondere des Adrenomedullins, auf die Tumorgenese und Gefäßentwicklung, ist eine wichtige Rolle seitens Progress und Malignisierung von Gliomen naheliegend.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR und Folkman J** 1997  
*Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94 (3): 861-866
2. **Arshad H, Ahmad Z, Hasan SH** 2010,  
*Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival.*  
Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(6):1637-40.
3. **Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Wink MR, Battastini OMA** 2007  
Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line.  
*J Neurooncol* 84:1–8
4. **Bello L, Carrabba G, Giussani C, Lucini V, Cerutti F, Scaglione F, Landré J, Pluderi M, Tomei G, Villani R, Carroll RS, Black PM, Bikfalvi A.** 2001  
*Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo.*  
Cancer Res. 15;61(20):7501-6.
5. **Benes L, Kappus C, McGregor GP, Bertalanffy H, Mennel HD, Hagner S** 2004  
*The immunohistochemical expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) in human gliomas.*  
J Clin Pathol. 2004 Feb;57(2):172-6.
6. **Boudouresque F, Berthois Y, Martin PM, Figarella-Branger D, Chinot O, Ouafik** 2005  
*Role of adrenomedullin in glioblastomas growth.*  
Bull Cancer. 2005 Apr; 92(4):317-26
7. **Brain SD, Grant AD** 2004  
*Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin.*  
*Physiol. Rev.* 2004;84:903–934
8. **Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, Macintyre I** 1985  
*Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator.*  
*Nature.* 1985;313:54–56
9. **Brem SS, Cotran RS und Folkman J** 1974  
*Angiogenesis in brain tumors: a quantitative histologic study.*  
Surg Forum 1974, 25 (0): 462-46

10. **Bühlmann N, Leuthäuser K, Muff R, Fischer JA, Born W 1999**  
*A receptor activity modifying protein (RAMP)2-dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1.*  
 Endocrinology. 1999 Jun;140(6):2883-9
11. **Burger PC, Kleihues P 1989**  
*Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies.*  
 Cancer, 1989 63(10): p. 2014-23.
12. **Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS 2002**  
*Surgical pathology of the nervous system and its coverings.*  
 4. ed. 2002, New York [u.a.]: Churchill Livingstone. XII, 657 S.
13. **Carey DJ 1991**  
*Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins.*  
 Annu Rev Physiol 53: 161-177
14. **Cheng SY, Huang HJS, Nagane M, Ji XD, Wang DG, Shih CCY, Arap W, Huang CM, Cavenee WK 1996**  
*Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumourangiogenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor.*  
 Proc Natl Acad Sci USA 93:8502-8507
15. **Cheung B, Leung R 1997**  
*Elevated plasma levels of human adrenomedullin in cardiovascular, respiratory, hepatic and renal disorders.*  
 Clin Sci 1997, 92:59-62
16. **Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM, Sexton PM 1999**  
*Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product.*  
 Mol Pharmacol. 1999 Jul;56(1):235-42
17. **Cimpean AM, Ribatti D, Raica M 2008**  
*The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis.*  
 Angiogenesis 11 (4): 311–9.

18. **Cornish J et al.** 1997  
*Adrenomedullin is a potent stimulator of osteoblastic activity in vitro and in vivo.*  
Am. J. Physiol. 273 E1113-1120
19. **Cottrell GS, Roosterman D, Marvizon JC, Song B, Wick E, Pikios S, Wong H, Berthelie C, Tang Y, Sternini C, Bunnett NW, Grady EF** 2005  
*Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat.*  
J Comp Neurol 490:239–255
20. **Cross MJ, Claesson-Welsh L** 2001  
*FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition.*  
Trends Pharmacol Sci. 2001 Apr;22(4):201-7. Review.
21. **Cuttita F, Camey DC, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fiscler A, Minna JD** 1985  
*Bombesin-like peptides can funktion as autocrine growth factor in human small-cell lung cancer.*  
Nature 316:823-826
22. **D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E** 2006  
*Peptide-based molecules in angiogenesis.*  
Chem Biol Drug Des. 2006 Feb;67(2):115-26. Review.
23. **Dong YL, Green KE, Vegiragu S, Hankins GD, Martin E, Chauthan M, Thota C, Yallampalli C** 2005  
*Evidence for decreased calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors and compromised responsiveness to CGRP of fetoplacental vessels in pre-clamptic pregnancies.*  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005;90:2336–2343
24. **oods H, Hallermayer G, Wu D, Entzeroth M, Rudolf K, Engel W & Eberlein W** 2000  
*Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist.*  
Br. J. Pharmacol., 129, 420–423
25. **Edvinsson L et al.** 1997  
*Expression of calcitonin gene-related peptide 1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries.*  
Neurosci. Lett., 229 (1997) 209-211

**D**

26. **Ehlenz K et al. 1997**  
*High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin.*  
 Exp Clin Endocrinol Diabetes 105:156–162
27. **Fischer MJ, Koulchitsky S, Messlinger K 2005**  
*The nonpeptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS lowers the activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus.*  
 J Neurosci 25:5877–5883
28. **Flühmann B, Lauber M, Lichtensteiger W, Fischer JA, Born W 1997**  
*Tissue-specific mRNA expression of a calcitonin receptor-like receptor during fetal and postnatal development.*  
 Brain Res. 1997 Nov 7;774(1-2):184-192
29. **Folkman J, Hanahan D 1991**  
*Expression of angiogenic phenotype during development of murine and human cancer. Origins of human cancer: A comprehensive review.* Cold Spring Harbr Laboratory Press, p 803-814
30. **Folkman J 1990**  
*What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?*  
 J Natl Cancer Inst. 1990 Jan 3;82(1):4-6
31. **Folkman J 2006**  
*Angiogenesis.*  
 Annu Rev Med. 2006;57:1-18. Review.
32. **Frayon S, Cueille C, Gnidéhou S, Vernejoul MC, Garel JM 2000**  
*Dexamethasone Increases RAMP1 and CRLR mRNA Expressions in Human Vascular Smooth Muscle Cells*  
 Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 270, Issue 3, 21 April 2000, Pages 1063-1067
33. **Garayoa M, Martinez A, Lee S, et al. 2000**  
*Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) upregulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis.*  
 Mol Endocrinol 2000;14:848–862
34. **Garcia MA, Martin-Santamaria S, de Pascual-Teresa B, Ramos A, Julian M & Martinez A 2006;**  
*Adrenomedullin: a new and promising target for drug discovery.*  
 Expert Opinion on Therapeutic Targets 10 303-317

35. **Gerhardt H, Betsholtz C** 2003  
*Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis*  
Cell Tissue Res 2003, 314 (1): 15-23
36. **Gimbrone MA Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J** 1972  
*Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization.*  
J Exp Md 136:261-276
37. **Guerin C, Wolff JE, Laterra J, Drewes LR, Brem H, Goldstein GW** 1992  
*Vascular differentiation and glucose transporter expression in rat gliomas: effects of steroids*  
Ann Neurol. 31 (5): 481-487
38. **Guidolin D, Albertin G., Spinazzi R, Sorato E, Mascarin A, Cavallo D, Antonello M, Ribatti D** 2008 **G**  
*Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human vascular endothelial cells: Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2*  
Peptides 29 (2008) 2013 – 2023
39. **Hagner S, Haberberger RV, Overkamp D, Hoffmann R, Voigt KH, McGregor GP** 2002 **H**  
*Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin.*  
Peptides. 2002 Jan;23(1):109-116
40. **Hagner S, Stahl U, Grimm T, Stürzl M, Lang RE** 2006  
*Expression of calcitonin receptor-like receptor in human vascular tumours.*  
Journal of Clinical Pathology 2006;59:1104-1107
41. **Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE** 2002  
*Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues.*  
Cell Tissue Res. 2002 Oct;310(1):41-50
42. **Hague S et al.** 2000  
*Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density.*  
Clin Cancer Res 3: 2808–2814
43. **Hall JM, Smith DM** 1998  
*Calcitonin gene-related peptide--a new concept in receptor-ligand specificity?*  
Trends Pharmacol Sci. 1998 Aug;19(8):303-305



44. **Hamada H et al.** 2002  
*Adrenomedullin stimulates the growth of cultured normal human osteoblasts as an autocrin/paracrin regulator.*  
Peptides 23 (2002) 2163-2168
45. **Hanahan D** 1997  
*Signaling vascular morphogenesis und maintenance.*  
Science Cell Biology - 1997, 277 (5322): 48-50
46. **Hanahan D, Folkman J** 1996  
*Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.*  
Cell 1996, 86 (3): 353-364
47. **Hattori Y et al.** 1998  
*Glucocorticoid regulation of adrenomedullin in a rat model of endotoxic shock.*  
Life Sci 62:L181–L189
48. **Hay DL et al** 2008  
*International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the Calcitonin Gene-Related Peptide Subtype 2 Receptor*  
Pharmacol Rev 60:143-145
49. **Hay DL, Walker CS and Poyner DR** 2011  
*Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges*  
Endocrine-Related Cancer 18 C1–C14
50. **Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbridge S, Edwards NA, Oldfield EH** 1996  
*Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of glucocorticoid receptor and vascular permeability factor.*  
J Clin Invest 98 (6):1400-1408
51. **Hernandez C, Burgos R, Canton A, Garcia-Arumi J, Segura RM, Simo R** 2001  
*Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study.*  
Diabetes Care 2001, 24 (3): 516-521
52. **Hinson et al.** 2000  
*Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide.*  
Endocrine Reviews 21: 138–167

53. **Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sadner P 2000**  
*Tissue hypoxia generation activates the adrenomedullin system in vivo.*  
 Am J. Physiol 2000;278:R513–519
54. **Imaizumi S, Shimizu H, Ahmad I, Kaminuma T, Tajima M, Yoshimoto T 1996**  
*Effect of calcitonin gene-related peptide on delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits.*  
 Surg Neurol. 1996 Sep;46(3):263-70; discussion 270-271
55. **Inoue T, Shimizu H, Kaminuma T, Tajima M, Watabe K, Yoshimoto T 1996**  
*Prevention of Cerebral Vasospasm by Calcitonin Gene-related Peptide Slow-release Tablet after Subarachnoid Hemorrhage in Monkeys.*  
 Neurosurgery. 39(5):984-990, November 1996
56. **Ishikawa T, Chen J, Wang J, et al. 2003**  
*Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis.*  
 Oncogene 2003;22:1238–1242
57. **Iwase T et al. 2005**  
*Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia.*  
 Circulation 111(3): 356–362
58. **Kamitani S, Asakawa M, Shimekake Y, Kuwasako K, Nakahara K, Sakata T 1999**  
*The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells.*  
 FEBS Lett. 1999 Apr 1;448(1):111-114
59. **Kato H et al. 1997**  
*Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells.*  
 Endocrinology 138(6): 2615– 2620
60. **Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J und Black PM 1998**  
*Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo.*  
 Cancer Res. 1998, 58 (20): 4654-4659
61. **Kitamura K et al. 1993**  
*Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.*  
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1993) 553-560

62. **Kitamuro T, Takahashi K, Nakayama M, Murakami O, Hida W, Shirato K, Shibahara S** 2000  
*Induction of adrenomedullin during hypoxia in cultured human glioma cells.*  
J Neurochem 75: 1826-1833
63. **Kleihues P, Louis D N, Scheithauer B W et al.** 2002  
*The WHO classification of tumors of the nervous system.*  
J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61:215–225
64. **Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, Westphal M, Lamszus K.** 2001  
*Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2.*  
Cancer Res. 2001 Sep 15;61(18):6624-8
65. **Kuratsu J, Ushio Y** 1997  
*Epidemiological study of primary intracranial tumours in elderly people.*  
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 63: 116-118
66. **Kuwasako K et al.** 1997  
*Plasma adrenomedullin in cerebrovascular disease: a possible indicator of endothelial injury.*  
Int Angiol 16:272–279
67. **Letizia C et al.** 1998  
*Circulating levels of adrenomedullin in patients with Addison's disease before and after corticosteroid treatment.*  
Clin Endocrinol (Oxf) 48:145–148
68. **Levy D, Burstein R, Strassman AM** 2005  
*Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine.*  
Ann Neurol 58:698 –705
69. **Liu J et al.** 1997  
*Adrenomedullin gene expression and its different regulation in human adrenocortical and medullary tumors.*  
J Endocrinol 155:483–490
70. **López J, Martínez A** 2002  
*Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin.*  
Int Rev Cytol. 2002;221:1-92. Review

71. **Louis DN and World Health Organization 2006**  
*WHO classification of tumours of the central nervous system: [...Editorial and Consensus Conference at the German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, November 17-18].* 4.ed World Health Organization Classification of tumours; 2007, Lyon: International Agency for Research of Cancer. 309 S.
72. **Martinez A et al. 2002**  
*The effects of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells.*  
 J Natl Cancer Inst 94(16): 1226–1237
73. **McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM 1998**  
*RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor.*  
 Nature **393**, 333–339
74. **Metellus P, Voutsinos-Porche B, Nanni-Metellus I, Colin C, Fina F, Berenguer C, Dussault N, Boudouresque F, Loundou A, Intagliata D, Chivot O, Martin PM, Figarella-Branger D, Ouafik L. 2011**  
*Adrenomedullin expression and regulation in human glioblastoma, cultured human glioblastoma cell lines and pilocytic astrocytoma.*  
 Eur J Cancer;47(11):1727-35. Epub 2011 Mar 31.
75. **Miller MJ et al. 1996**  
*Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor.*  
 J Biol Chem 271:23345–23351
76. **Moody TW, Miller MJ, Martinez E, Unsworth E, Cutitta F 1997**  
*Adrenomedullin binds with high Affinity, elevates cyclic AMP, and stimulates c-fos mRNA in C6 glioma cells.*  
 Peptides 18:1111-1115
77. **Muff R, Born W, Fischer JA 1995**  
*Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions.*  
 Eur J Endocrinol. 1995 Jul;133(1):17-20
78. **Muff R, Bühlmann N, Fischer JA, Born W 1999**  
*An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3.*  
 Endocrinology. 1999 Jun;140(6):2924-2927

79. **Nakayama M et al. 1998**  
*Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells.*  
 Biochem Biophys Res Commun 243:514–517
  
80. **Nakayama M et al. 1998**  
*Production and secretion of two vasoactive peptides, endothelin-1 and adrenomedullin, by a colorectal adenocarcinoma cell line, DLD-1.*  
 J Cardiovasc Pharmacol 31(Suppl 1):S534–S536
  
81. **Naot D, Callon KE, Grey A, Cooper GJ, Reid IR, Cornish J 2001**  
*A potential role for adrenomedullin as a local regulator of bone growth.*  
 Endocrinology 142 (2001) 1849-1857
  
82. **Nikitenko LL, Cross T, Campo L, Turley H, Leek R, Manek S, Bicknell R, Rees MCP 2006**  
*Expression of Terminally Glycosylated Calcitonin Receptor-Like Receptor in Uterine Leiomyoma: Endothelial Phenotype and Association with Microvascular Density.*  
 Clin. Cancer Res., October 1, 2006; 12(19): 5648 - 5658
  
83. **Oehler MK et al. 2001**  
*Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth.*  
 Oncogene 20: 2937–2945
  
84. **Ogita T, Hashimoto E, Nakaoka T, Okabe F, Kira Y, Matsuoka R, Fujita T 1997**  
*Hypoxia induces adrenomedullin gene expression and secretion in cultured umbilical vein endothelial cells.*  
 Circulation 96:962
  
85. **Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Br  nner N, Martin PM 2002**  
*Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo.*  
 Am J Pathol. 2002 Apr;160(4):1279-1292
  
86. **Plate KH, Breier G, Weich HA und Risau W 1992**  
*Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.*  
 Nature 1992, 359 (6398): 845-848

87. **Plate KH** 1999  
*Mechanisms of angiogenesis in the brain.*  
J Neuropathol Exp Neurol 1999, 58 (4): 313-320
88. **Plate KH, Risau W** 1995  
*Angiogenesis in malignant gliomas.*  
Glia 1995 15 (3): 339-347
89. **Plate KH, Mennel HD** 1995  
*Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors.*  
Exp Toxicol Pathol 47: 89-94
90. **Poyner D R et al.** 2001  
*International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-Related Peptides, Adrenomedullin, Amylin, and Calcitonin Receptors;*  
Pharmacol Rev 54:233–246.
91. **Preston-Martin S, Lewis S, Winkelmann R, Borman B, Auld J, Pearce N** 1993  
*Descriptive epidemiology of primary cancer of the brain, cranial nerves, and cranial meninges in New Zealand, 1948-88.*  
Cancer Causes Control. 4: 529-538
92. **Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos C, Grimley C, Battey J, Mulshine JL, Cuttitta F** 1996  
*Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines.*  
J Biol Chem 271:11477-11483
93. **Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H** 2002  
*Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin.*  
Acta Neuropathol (Berl) 2002, 104 (1): 85-91
94. **Ribatti D, Vacca A, Presta M** 2000  
*The discovery of angiogenic factors: a historical review.*  
Gen Pharmacol. 2000 Nov;35(5):227-231. Review
95. **Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG** 2007  
*Nonclassic Endogenous Novel Regulators of Angiogenesis.*  
Pharmacol Rev 59:185-205
96. **Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolois O, Rogister B, Merville MP, Bours V** 2005  
*Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells.*  
BMC Cancer 5:32

97. **Rüegg C** 2006  
*Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions.*  
J Leukoc Biol. 2006 Oct;80(4):682-4. Epub 2006 Jul 18. Review
98. **Rusnati M, Presta M** 2006  
*Extracellular angiogenic growth factor interactions: an angiogenesis interactome survey.*  
Endothelium. 2006 Mar-Apr;13(2):93-111. Review.
99. **Saleh M, Stacker SA, Wilks AF** 1996  
*Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence.*  
Cancer Res 56:393-401
100. **Schwarz N, Renshaw D, Kapas S, Hinson JP** 2006  
*Adrenomedullin increases the expression of calcitonin-like receptor and receptor activity modifying protein 2 mRNA in human microvascular endothelial cells.*  
J. Endocrinol. 190(2):505-514
101. **Sexton P M, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N** 2001  
*Receptor activity modifying proteins.*  
Cellular Signalling 13 (2001) 73-83
102. **Sone M, Takahashi K, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Ohneda M, Sasano H, Ito H, Mouri T** 1997  
*Specific adrenomedullin binding sites in the human brain.*  
Peptides 18:1125-1129
103. **Storer RJ, Akerman S, Goadsby PJ** 2004  
*Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigemino-vascular transmission in the cat.*  
Br J Pharmacol 142:1171-1181
104. **Stratmann A, Acker T, Burger AM, Amann K, Risau W, Plate KH** 2001  
*Differential inhibition of tumor angiogenesis by tie2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 dominant negative receptor mutants.*  
Int J Cancer 91:273-282
105. **Sutter B, Suzuki S, Arthur AS, Kassell NF, Lee KS** 1995  
*Effects of subarachnoid hemorrhage on vascular responses to calcitonin gene-related peptide and its related second messengers.*  
J Neurosurg. 1995 Sep;83(3):516-521

106. **Takahashi K et al. 1997**  
*Production and secretion of adrenomedullin from glial cell tumors and its effects on cAMP production – A growth factor?*  
 Peptides 18:1117–1124
107. **Takahashi K et al. 1998**  
*Expression of adrenomedullin mRNA in adrenocortical tumors and secretion of adrenomedullin by cultured adrenocortical carcinoma cells.*  
 Peptides 19:1719–1724
108. **Takahashi K, Udono-Fujimori R, Totsune K, Murakami O, Shibahara S 2003**  
*Suppression of cytokine-induced expression of adrenomedullin and endothelin-1 by dexamethasone in T98G human glioblastoma cells*  
 Peptides 24:1053-1062
109. **Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A 2005**  
*The role of mast cells in migraine pathophysiology.*  
 Brain Res Rev 49:65–76
110. **Uzan B, deVernejoul MC, Cressent M 2004**  
*RAMPs and CRLR expressions in osteoblastic cells after dexamethasone treatment*  
 Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 321, Issue 4, 3 September 2004, Pages 802-808
111. **Vu TH , Werb Z 2000**  
*Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.*  
 Genes Dev 2000, 14 (17): 2123-2133
112. **Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Clark RK, Willette RN, Sulpizio AC, Aiyar NV, Ruffolo Jr. RR, Feuerstein GZ 1995**  
*Discovery of Adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence of its role in exacerbating focal brain ischemic damage.*  
 Proc Natl Acad Sci USA 92:11480-11484
113. **Weller RO, Foy M, Cox S 1977**  
*The development and ultrastructure of the microvasculature in malignant Gliomas.*  
 Neuropath. and appl. Neurobiol 1977, 3 307-322
114. **Zülch KJ 1980**  
*Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors.*  
 Neuroradiology. 19: 59-66



## **7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungen**

- Abbildung 1: (Seite 11) Schematisches Diagramm eines humanen CRLR und RAMP1 [90]
- Abbildung 2: (Seite 12) Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen mit RAMP's. [101]
- Abbildung 3: (Seite 13) Schemazeichnung des CRLR-Rezeptorkomplexes mit dem benachbarten G-Protein.
- Abbildung 4: (Seite 23) Aufbereitung der RNA für die RT-PCR.
- Abbildung 5: (Seite 26) Aufbau der Probe zur PCR.
- Abbildung 6: (Seite 29) Schematische Darstellung der Bestandteile bei der PAP-Methode.
- Abbildung 7: (Seite 33) Invertierte UV-Licht-Photographie des Agarosegels.
- Abbildung 8: (Seite 35) CRLR-Färbung einer großen Vene in einem Gliom. Darstellung der CRLR-Positivität des Endothels.
- Abbildung 9: (Seite 35) CRLR-Färbung eines Gefäßkonglomerates im Stadium der Migration in einem Gliom. Darstellung der CRLR-Positivität des Endothels.
- Abbildung 10: (Seite 36) CRLR-Färbung von girlandenförmigen Kapillaren innerhalb eines Glioblastoms.
- Abbildung 11: (Seite 36) CRLR-Färbung eines großen, arteriellen Gefäßes in einem Glioblastom.

- Abbildung 12: (Seite 38) CRLR positive Astrozyten mit typischem Erscheinungsbild.
- Abbildung 13: (Seite 38) Gefäßnahe und gefäßferne CRLR positive Astrozyten innerhalb eines Glioms.
- Abbildung 14: (Seite 39) CRLR positive Astrozyten im lockeren Netzwerk eines fibrillären Astrozytoms.
- Abbildung 15: (Seite 39) Pathologisches Gefäß in einem Glioblastom umschlossen von CRLR positiven Tumorzellen.
- Abbildung 16: (Seite 40) CRLR positives Neuron.
- Abbildung 17: (Seite 41) CRLR positive Riesentumorzelle in einem Glioblastom.
- Abbildung 18: (Seite 42) CRLR-Färbung eines Blutgefäßes in einem Glioblastom im Vergleich zur GFAP-Färbung (Abb. 23).
- Abbildung 19: (Seite 42) GFAP-Färbung komplementär zum Präparat in Abbildung 22.
- Abbildung 20 (Seite 44) Boxplot Diagramm zur Darstellung der Verteilung GFAP- und CRLR-positiver Zellen in Abhängigkeit vom WHO-Grad
- Abbildung 21 (Seite 46) Verteilung der Mittelwerte GFAP- und CRLR-positiver Zellen geordnet aufsteigend nach GFAP der Präparate vom WHO °II
- Abbildung 22 (Seite 47) Verteilung der Mittelwerte GFAP- und CRLR-positiver Zellen geordnet aufsteigend nach GFAP der Präparate vom WHO °III

Abbildung 23 (Seite 48) Verteilung der Mittelwerte GFAP- und CRLR-positiver Zellen geordnet aufsteigend nach GFAP der Präparate vom WHO °IV

## Tabellen

Tabelle 1: (Seite 6) Tabellarische Darstellug der aktuellen WHO-Klassifikation modifiziert nach Kleihues (Lehrbuch der Pathologie; Böcker/Denk/Heinz Urban&Fischer Verlag 2001)

Tabelle 2: (Seite 27) Tabellarische Auflistung der untersuchten Tumorentitäten

Tabelle 3: (Seite 30) Schematische Darstellung des Immunoreactive Score nach **Remmele W, Stegner HE** 1987 *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue* Pathologe. 1987 May;8(3):138-40

Tabelle 4: (Seite 44) Analyse der Häufigkeiten GFAP- und CRLR-positiver Zellen ohne Berücksichtigung der Färbeintensitäten.

Tabelle 5: (Seite 45) Analyse der Immunoreaktivität von GFAP und CRLR nach Anwendung des IRS.

Tabelle 6: (Seite 49) Korellation der gepaarten Stichproben aus den GFAP- und CRLR-Präparaten in Abhängigkeit vom jeweiligen WHO-Grad

Tabelle 7: (Seite 50) Auswertung und Analyse der einzelnen Korellationskoeffizienten aus den Gesamtzellzahlen in den Präparaten

- **Lebenslauf**

Name: **Christoph Kappus**

Adresse: **Am Rabenstein 8  
35039 Marburg**

geboren: **27.04.1973 Frankfurt/Main**

Nationalität: **deutsch**

Familienstand: **verheiratet, 3 Kinder**

**1979-1983      Grundschule Marbach**

**1983-1993      Gymnasium Martin-Luther-Schule Marburg**

**15.06.1993      Hochschulreife    Marburg**

**01.07.93        Zivildienst am Uni-Klinikum Marburg**

**01.10.94 -      Arbeitverträge als Krankenpflegehelfer Uni-Klinikum Marburg**

**05.09.96        Beginn Studium der Humanmedizin Phillips-Universität Marburg**

**11.09.98        Ärztlich Vorprüfung**

**31.08.99        Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

**WS 1999        Beginn Studium der Informatik Philipps-Universität Marburg**

**11.11.02        Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

**20.05.03        Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

**21.06.03        Heirat mit Katrin Engelhardt**

**01.08.03        AIP Neurochirurgie, Uni-Klinikum Marburg**

**01.10.04        Arzt, Neurochirurgie, Uni-Klinikum Marburg**

**11.08.10        Facharzt für Neurochirurgie**

Marburg, 05.01.2013      Christoph Kappus

- **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Barth, Bertalanffy, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Feuser, Giese, Gotthardt, Gotzen, Griss, Happle, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lennartz, Lippert, Lotz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Niessing, Oertel, Pfab, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schüffel, Schulz, Seyberth, Steininger, Sundermeyer, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, von Wichert

- **Danksagung**

Danken möchte ich allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt:

- Meinen Eltern, die mich jederzeit mental und finanziell unterstützt haben
- Meinen Kindern, die meine physikalische Abwesenheit während der Erstellung der Dissertationsschrift großzügig toleriert haben
- PD Dr. L. Benes für die Bereitstellung des anspruchsvollen und ergiebigen Themas, sowie die Betreuung bei der Durchführung
- Frau Dr. S. Hagner-Benes für die fachliche Betreuung außerhalb der regulären Arbeitszeiten
- Herrn Prof. Dr. H. D. Mennel für die Hilfestellung bezüglich der histopathologischen Beurteilung, die Bereitstellung der Präparate und Zelllinien sowie die wiederholte Durchsicht und Korrektur der Dissertationsschrift
- Den Technischen Assistentinnen der Abteilung für Neuropathologie für die liebevolle Hilfe bei der Aufarbeitung der Präparate
- Herrn M. Limberg, für die Durchsicht und germanistische Korrektur der Dissertationsschrift

Auch allen hier nicht namentlich erwähnten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich für die Zusammenarbeit ganz herzlich danken.

- **Ehrenwörtliche Erklärung**

über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Die Expression des Calcitonin receptor-like receptors in humanen Gliomen

in der Klinik für Neurochirurgie unter Leitung von Prof. Dr. H. Bertalanffy mit Unterstützung durch PD Dr. L. Benes ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan:

Journal of Clinical Pathology (Benes L, Kappus C, McGregor GP, Bertalanffy H, Mennel HD, Hagner S *The immunohistochemical expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) in human gliomas*. 2004 Feb;57(2):172-6.) veröffentlicht.

Marburg, 14. Oktober 2014, Christoph Kappus